CDC 2019-新規コロナウイルス（2019-nCoV）
リアルタイムRT-PCR診断パネル

緊急使用のみ

使用説明書

カタログ番号2019-nCoVEUA-01
1000反応

にとって *試験管内*で診断（IVD）の使用

Rxのみ

疾病管理予防センターウイルス性疾患部
門
1600 Clifton Rd NE
Atlanta GA 30329

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

目次

使用目的

CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、上気道および下気道の検体（医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人から収集した鼻咽頭または口腔咽頭スワブ、喀痰、下気道吸引物、気管支肺胞洗浄、および鼻咽頭洗浄/吸引物または鼻吸引物として）1.1。

この検査は、最大4つの個々の上気道スワブ検体（鼻咽頭（NP）、中咽頭（OP）、NP / OPの組み合わせ、または鼻腔）を含むプールされたサンプル中のSARS-CoV-2からの核酸の定性的検出にも使用されます。医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人からの輸送媒体を含む個々のバイアルを使用して収集した綿棒）。プールされたテストからの否定的な結果は、決定的なものとして扱われるべきではありません。患者の臨床徴候および症状が否定的な結果と矛盾する場合、または患者管理に結果が必要な場合は、患者を個別の検査の対象と見なす必要があります。結果が陽性、不確定、または無効であるプールに含まれる標本は、結果を報告する前に個別にテストする必要があります。

テストは、1988年の臨床検査改善修正（CLIA）、42USC§263aの下で認定された、高度に複雑なテストを実行するための要件を満たす検査室に限定されています。

結果はSARS-CoV-2RNAの同定のためのものです。SARS-CoV-2 RNAは一般に、感染時に上気道および下気道の検体で検出可能です。陽性の結果は、SARS-CoV-2による活発な感染を示していますが、細菌感染または他のウイルスとの同時感染を除外するものではありません。検出された薬剤は、病気の明確な原因ではない可能性があります。米国およびその領土内の研究所は、すべての結果を適切な公衆衛生当局に報告する必要があります。

否定的な結果はSARS-CoV-2感染を排除するものではなく、治療または他の患者管理の決定の唯一の基礎として使用されるべきではありません。否定的な結果は、臨床観察、患者の病歴、および疫学情報と組み合わせる必要があります。

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用したテストは、リアルタイムRT-PCRアッセイの実行に熟練した訓練を受けた実験室職員による使用を目的としています。CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、食品医薬品局の緊急使用許可の下でのみ使用されます。

---

1 このEUAの場合、医療提供者には、医師、看護師、薬剤師、技術者、研究所長、疫学者、またはその他の開業医や関連する医療専門家が含まれますが、これらに限定されません。

まとめと説明

中国湖北省武漢市での原因不明の肺炎の発生は、2019年12月31日にWHOに最初に報告されました。中国当局は、新しいコロナウイルス（2019-nCoV、SARS-CoV-2とも呼ばれます）を特定しました。その結果、世界中で何百万もの人間の感染が確認されました。無症候性感染症、軽度の病気、重度の病気、および死亡の症例が報告されています。

CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルは分子です *試験管内で* SARS-CoV-2感染の検出と診断を支援し、広く使用されている核酸増幅技術に基づく診断テスト。この製品には、オリゴヌクレオチドプライマーと二重標識加水分解プローブ（TaqMan®）、およびrRT-PCRで使用されるコントロール材料が含まれています。*試験管内*で 呼吸器検体中の2019-nCoVRNAの定性的検出。

「認定ラボ」という用語は、すべてのユーザー、アナリスト、およびこのデバイスの使用結果を報告するすべての人が、使用前に有能なインストラクターによってこの手順の結果を実行および解釈するようにトレーニングされる必要があるラボを指します。

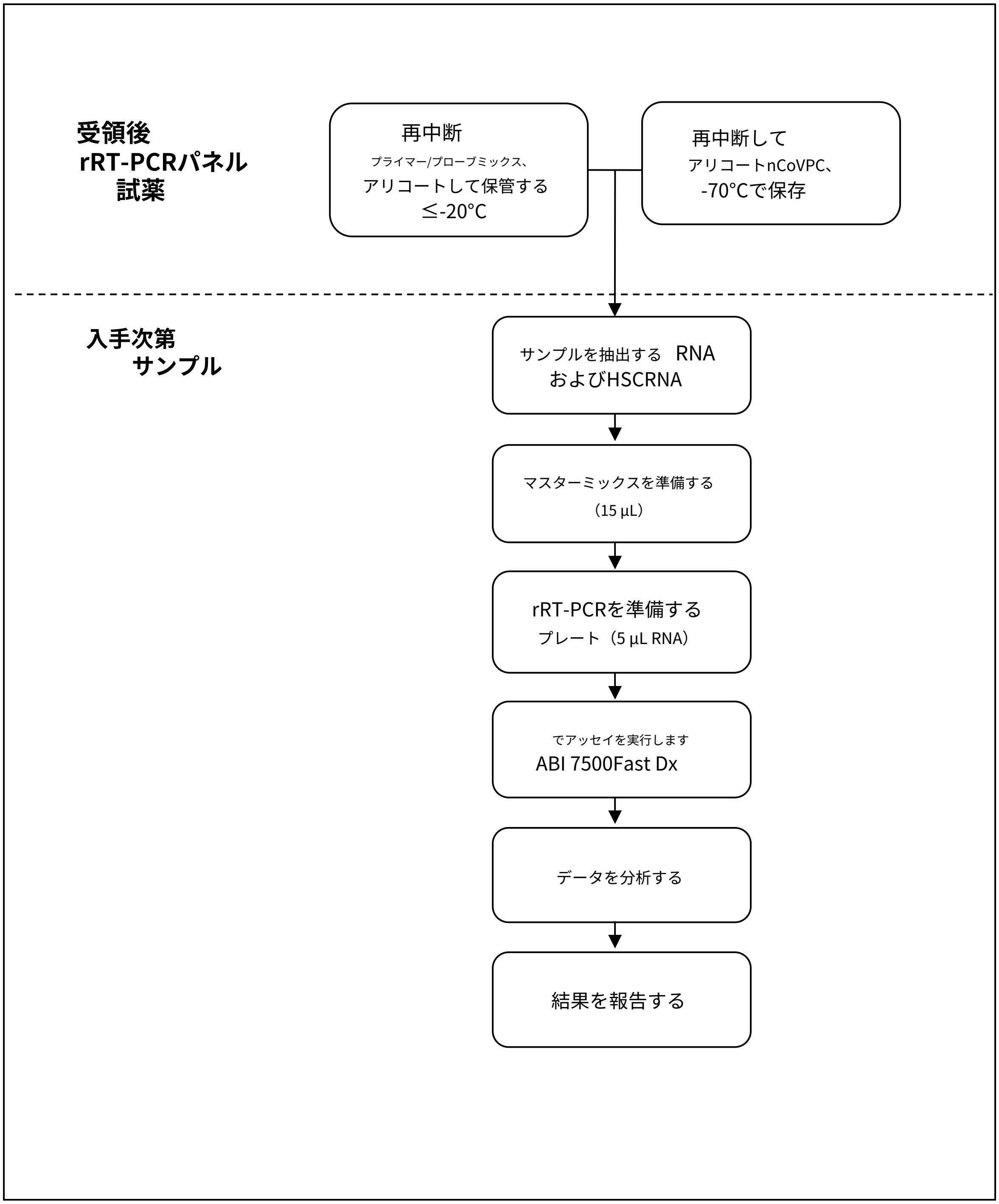
手順の原則

2019-nCoVを検出するためのオリゴヌクレオチドプライマーとプローブは、ウイルスのヌクレオカプシド（N）遺伝子の領域から選択されました。パネルは、SARS-CoV-2（2つのプライマー/プローブセット）を特異的に検出するように設計されています。コントロールサンプルおよび臨床検体中のヒトRNaseP遺伝子（RP）を検出するための追加のプライマー/プローブセットもパネルに含まれています。

上気道および下気道の検体から分離および精製されたRNAは、cDNAに逆転写され、その後、SDSバージョン1.4ソフトウェアを備えたApplied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCR装置で増幅されます。このプロセスでは、プローブはフォワードプライマーとリバースプライマーの間にある特定のターゲット配列にアニーリングします。PCRサイクルの延長段階で、Taqポリメラーゼの5 'ヌクレアーゼ活性によりプローブが分解され、レポーター色素がクエンチャー色素から分離し、蛍光シグナルが生成されます。各サイクルで、追加のレポーター色素分子がそれぞれのプローブから切断され、蛍光強度が増加します。蛍光強度は、SDSバージョン1.4ソフトウェアを備えたApplied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCRシステムによって各PCRサイクルで監視されます。

ウイルスRNAの検出は、病気の診断に役立つだけでなく、疫学的および監視情報も提供します。

準備とテストプロセスの概要



必要な材料（提供）

注：CDCは、診断パネルに含まれるCDCプライマーおよびプローブセットおよび/またはポジティブコントロールの代替として受け入れられる、市販の多くのプライマーおよびプローブセットおよび/またはポジティブコントロール材料のリストをWebサイトに保持します。CDC International Reagent Resourceを通じて配布された資料と、CDC Webサイトに投稿された特定のロットの資料のみが、CDCの緊急使用許可の下でこのアッセイで使用できます。

プライマーおよびプローブ材料および/またはポジティブコントロール材料の許容可能な代替ロットのこのリストで利用可能になります：
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/virus-requests.html

プライマーとプローブ：

カタログ＃2019-nCoVEUA-01診断パネルボックス＃1：

試薬ラベル	*部 #*	*説明*	*量/チューブ*	*反応/チューブ*
2019-nCoV_N1	RV202001 RV202015	2019-nCoV_N1 プライマー/プローブミックスの組み合わせ	22.5 nmol	1000
2019-nCoV_N2	RV202002 RV202016	2019-nCoV_N2複合プライマー/プローブミックス	22.5 nmol	1000
RP	RV202004 RV202018	ヒトRNaseP複合プライマー/プローブミックス	22.5 nmol	1000

ポジティブコントロール（以下の製品のいずれかが許容されます）：カ

タログ＃2019-nCoVEUA-01診断パネルボックス＃2：

試薬ラベル	*部 #*	*説明*	*量*	*ノート*
nCoVPC	RV202005	2019-nCoVポジティブコントロール（nCoVPC） CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル手順でポジティブコントロールとして使用します。nCoVPCには、乾燥状態で供給される非感染性のポジティブコントロール材料が含まれているため、使用前に再懸濁する必要があります。nCoVPCはで構成されています*試験管内*で転写されたRNA。nCoVPCは、RPを含む2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの各アッセイで陽性の結果をもたらします。	4本のチューブ	提供します（800）5 µL テスト反応

カタログ＃VTC-04 CDC 2019-nCoVポジティブコントロール（nCoVPC）

試薬 ラベル	***部 #***	***説明***	***量***	***ノート***
nCoVPC	RV202005	2019-nCoVポジティブコントロール（nCoVPC） CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル手順でポジティブコントロールとして使用します。nCoVPCには、乾燥状態で供給される非感染性のポジティブコントロール材料が含まれているため、使用前に再懸濁する必要があります。nCoVPCはで構成されています*試験管内*で転写されたRNA。nCoVPCは、RPを含む2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの各アッセイで陽性の結果をもたらします。	4本のチューブ	提供します（800）5 µL テスト反応

必要な材料（ただし提供されていません）

ヒト検体管理（HSC）

説明	量	CDCカタログ番号
CDCによって製造されました。核酸の回収の成功と抽出試薬の完全性を実証するための核酸抽出手順制御として使用します。HSCは、pH 7.2〜7.4の0.01 MPBSに懸濁した液体として供給される非感染性（ベータプロピオラクトン処理）培養ヒト細胞材料で構成されています。	10バイアルx500 µL	KT0189

HSCの許容可能な代替案：

- 陰性ヒト検体材料：検査室は、抽出コントロールとして臨床サンプルと一緒に抽出および実行するために、大量のヒト検体材料（例えば、ヒト血清またはプールされた残りの陰性呼吸検体）を準備する場合があります。この材料は、複数の実行で使用するのに十分な量で準備する必要があります。材料は、抽出コントロールとして使用する前にテストして、これらの使用説明書に記載されているHSCで期待される結果が得られることを確認する必要があります。

- 人工ヒト検体材料：実験室では、ヒト細胞株（A549、Hela、293など）をPBSに懸濁することにより、人工ヒト検体材料を調製できます。この材料は、複数の実行で使用するのに十分な量で準備する必要があります。材料は、抽出コントロールとして使用する前にテストして、これらの使用説明書に記載されているHSCで期待される結果が得られることを確認する必要があります。

CDCは、CDCの緊急使用許可の下で、このアッセイでの使用が許容される商業的に代替の抽出コントロールのリストをWebサイトに保持します。
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/virus-requests.html

rRT-PCR酵素マスターミックスオプション

試薬	量	カタログ番号
Quantabio qScriptXLTワンステップRT-qPCRToughMix	100x20µLrxns（1 x 1 mL）	95132-100
	2000x20µLrxns（1 x 20 mL）	95132-02K
	500x20µLrxns（5 x 1 mL）	95132-500
Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）	100 x 20 µL rxns（500 µL）	95166-100
	500x20µLrxns（5 x 500 µL）	95166-500
	1000x20µLrxns（1 x 5 mL）	95166-01K
PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム	200x20µLrxns（2 mL）	A6120
	1250x20µLrxns（12.5 mL）	A6121
ThermofisherTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス、CG	1000反応	A15299
	2000反応	A15300

RNA抽出オプション

以下にリストされているキットのそれぞれについて、CDCは外部溶解バッファーがSARS-CoV-2の不活化。

楽器/メーカー	抽出キット	カタログ番号
QIAGEN	[2]QIAmpDSPウイルスRNAミニキット	50回の抽出（61904）
	[2]QIAampウイルスRNAミニキット	50回の抽出（52904） 250回の抽出（52906）
QIAGEN EZ1 Advanced XL	[2]EZ1DSPウイルスキット	48回の抜歯（62724） バッファーAVL（19073または19089） EZ1 Advanced XL DSPウイルスカード（9018703）
	[2]EZ1ウイルスミニキットv2.0	48回の抽出（955134）バッファー AVL（19073または19089） EZ1 Advanced XL Virus Card v2.0（9018708）
Roche MagNA Pure 24	[2]MagNA Pure24トータルNAアイソレーションキット	96回の抽出（07 658 036 001） 外部の溶解緩衝液（06 374 913 001、12 239 469 103、03 246 779 001または03 246 752 001）
Roche MagNA Pure 96	[2]DNAおよびウイルスNA小容量キット	576回の抽出（06 543 588 001） 外部の溶解緩衝液（06 374 913 001、12 239 469 103、03 246 779 001または03 246 752 001）
[1]ロシュマグナピュアLC	[2]トータル核酸キット	192回の抽出（03 038 505 001）

楽器/メーカー	抽出キット	カタログ番号
[1]ロシュMagNAピュアコンパクト	[2]核酸分離キットI	32回の抽出（03 730 964 001）
PromegaMaxwell®RSC48およびMaxwell®CSC48	[3]Maxwell®RSCウイルス全核酸精製キット	48回の抽出（AS1330）144回の抽出（ASB1330）
[1]QIAGEN QIAcube	[2]QIAmpDSPウイルスRNAミニキット	50回の抽出（61904）
	[2]QIAampウイルスRNAミニキット	50回の抽出（52904） 250回の抽出（52906）
[1、3]bioMérieuxNucliSENS®easyMAG®と[1、3]bioMérieuxEMAG®（自動磁気抽出試薬は別売りです。両方の機器は同じ試薬と使い捨てを使用し、ヒントを除く。）		EasyMAG®磁気シリカ（280133）EasyMAG®溶解バッファー（280134）EasyMAG®溶解バッファー、2 mL（200292）EasyMAG®洗浄バッファー1、2、および3（280130、280131、280132） EasyMAG®ディスポーザブル（280135） Biohitピペットチップ（easyMAG®のみ）（280146） EMAG®1000µLチップ（418922）

[1]ウイルスRNAを抽出するためのこれらの抽出プラットフォームの同等性とパフォーマンスは、CDCヒトインフルエンザウイルスリアルタイムRT-PCR診断パネル（K190302）で実証されました。2019-nCoV（SARS CoV-2）を使用したこれらの抽出プラットフォームのパフォーマンス特性は実証されていません。

[2]CDCは、この抽出法で使用される外部溶解バッファーがSARS-CoV-2の不活化に有効であることを確認しています。

[3]CDCは、この抽出方法で使用される溶解緩衝液中の不活化剤の濃度を比較し、SARS-CoV-2の不活化に有効であることがわかった濃度の範囲内にあると決定しました。

抽出の代替：

試薬が世界的に不足しているために検査室がテスト需要をサポートするのに十分な抽出試薬にアクセスできない場合、CDCはQuantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）、CGを使用して上気道検体の熱処理手順を評価しました。性能は同等でしたが、この方法は限られた数の臨床検体で評価されており、阻害物質のキャリーオーバーまたはRNA分解による感度の潜在的な低下を排除することはできません。これは、管轄区域が、感度の潜在的な損失のリスクを正当化するのに十分なテストの必要性があると判断した場合にのみ使用する必要があります。決定的でないまたは無効な結果を生成する熱処理された標本は、再試験の前に認可された抽出方法で抽出する必要があります。

必要な機器と消耗品（ただし提供されていません）

ボルテックスミキサー

マイクロ遠心機

マイクロピペット（2または10µL、200µLおよび1000µL）

マルチチャンネルマイクロピペット（5-50µL）
1.5mLマイクロ遠心チューブ用ラック2x96ウェ
ル-20°Cコールドブロック
SDS1.4ソフトウェアを備えた7500Fast Dx Real-Time PCR Systems（AppliedBiosystems;カタログ
＃4406985または＃4406984）
抽出システム（機器）：QIAGEN EZ1 Advanced XL、QIAGEN QIAcube、Roche MagNA Pure 24、Roche MagNA Pure 96、PromegaMaxwell®RSC48、Roche MagNA Pure LC、Roche MagNA Pure Compact、bioMérieuxeasyMAG、bioMérieuxEMAG
分子グレードの水、ヌクレアーゼフリー
10%漂白剤（市販の5.25-6.0%次亜塩素酸塩漂白剤の1:10希釈）DNA ザップTM（野心、猫。＃AM9890）または同等のもの
RNaseAWAY™（Fisher Scientific;カタログ番号21-236-21）または同等の使い捨てパウダーフリー手袋および手術着
エアロゾルバリアピペットチップ
1.5 mLマイクロ遠心チューブ（DNase / RNaseフリー）
0.2 mL PCR反応プレート（Applied Biosystems;カタログ＃4346906または＃4366932）
MicroAmp Optical 8キャップストリップ（Applied Biosystems;カタログ＃4323032）

適格な代替コンポーネント：

ラボが許可されていない代替コンポーネント（抽出方法やPCR機器など）を使用してこのテストを変更した場合、変更されたテストはこのEUAでは許可されません。5月11日に更新された公衆衛生緊急事態中のコロナウイルス病の診断テストに関するFDAのポリシー-2019 2020年、これは変わりません。このポリシーの一部として、FDAは、EUAまたはEUAの修正を取得せずに、ラボがEUA認定テストを変更する場合、異議を唱えるつもりはありません。変更されたテストは、EUAへのブリッジング調査を使用して検証されます。 -認定テスト。

警告と注意事項

- にとって *試験管内で* 診断使用（IVD）。
  - このテストはFDAの認可または承認を受けていません。このテストは、高度に複雑なテストを実行するための要件を満たすCLIA、42USC§263aの下で認定された研究所による使用のためにEUAの下でFDAによって承認されています。
  - この検査は、SARS CoV-2からの核酸の検出についてのみ許可されており、他のウイルスや病原体については許可されていません。
  - この検査は、連邦食品医薬品のセクション564（b）（1）に基づくCOVID-19の検出および/または診断のためのinvitro診断検査の緊急使用の承認を正当化する状況が存在するという宣言の期間中にのみ承認されます。および化粧品法、21USC§360bbb-3（b）（1）。ただし、許可がより早く終了または取り消される場合を除きます。

- 標準的な注意事項に従ってください。すべての患者検体と陽性対照は、潜在的に感染性があると見なされ、それに応じて取り扱われるべきです。
- 試薬や人体標本を取り扱う場所で、飲食、喫煙、化粧品の塗布、コンタクトレンズの取り扱いを行わないでください。

- 安全な実験手順を使用して、感染性のようにすべての検体を取り扱います。2019-nCoVに関連する検体の取り扱いと処理に関する暫定実験室バイオセーフティガイドラインを参照してくださいhttps://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html。
- 検体の処理は、国の生物学的安全規制に従って実行する必要があります。

- 公衆衛生当局が推奨する現在の臨床的および疫学的スクリーニング基準に基づいて2019-nCoVの感染が疑われる場合は、適切な感染管理予防策を講じて検体を収集する必要があります。
- パフォーマンス特性は、呼吸器感染症の兆候と症状のあるヒト患者からのヒト上気道検体と下気道検体で決定されています。

- クラスII（またはそれ以上）の生物学的安全キャビネット（BSC）内で生ウイルスサンプルのすべての操作を実行します。
- このアッセイを実行し、サンプル、試薬、ピペット、その他の機器や試薬などの材料を取り扱う際は、キット試薬 を取り扱う際に、手袋、目の保護具、白衣などの個人用保護具を使用してください。
- PCRなどの増幅技術は、以前の増幅反応からのPCR産物の偶発的な導入に敏感です。増幅産物（アンプリコン）の偶発的な導入により、増幅ステップで使用される臨床検体またはリアルタイム試薬のいずれかが汚染された場合、誤った結果が生じる可能性があります。ラボでのワークフローは、一方向に進める必要があります。

  アッセイのセットアップと核酸の取り扱いのために別々の領域を維持します。
  ご使用前に必ず有効期限をご確認ください。期限切れの試薬は使用しないでください。異なるキットロットまたは他のメーカーの試薬を代用または混合しないでください。すべての手動液体移送の間にエアロゾルバリアピペットチップを交換します。
  サンプルの準備中は、サンプル間の相互汚染や、抽出手順中および抽出手順後のサンプルへのヌクレアーゼの不注意な導入のリスクを最小限に抑えるために、優れた実験技術への準拠が不可欠です。核酸を扱うときは、常に適切な無菌操作を使用する必要があります。
  アッセイのセットアップと抽出された核酸の取り扱いのために、個別の専用機器（ピペット、マイクロ遠心機など）と消耗品（マイクロ遠心チューブ、ピペットチップなど）を維持します。
  アッセイを設定するときは、清潔な白衣と粉末のない使い捨て手袋（以前は着用していません）を着用してください。
  サンプル間および汚染が疑われる場合はいつでも手袋を交換してください。試薬チューブと反応チューブは、可能な限り蓋をするか、覆ってください。プライマー、プローブ（アリコートを含む）、および酵素マスターミックスは、調製および使用中は常に解凍し、コールドブロック上で維持する必要があります。
  作業台、ピペット、および遠心分離機は、10％漂白剤、DNAなどの洗浄剤で洗浄および除染する必要があります。 ザップ™およびRNaseAWAY™ 核酸汚染のリスクを最小限に抑えるため。残留漂白剤は70％エタノールを使用して除去する必要があります。
- RNAは、安定性を確保するために、準備および使用中はコールドブロックまたは氷上で維持する必要があります。
- 未使用のキット試薬 とヒト検体は、地域、州、および連邦の規制に従って廃棄してください。

試薬の保管、取り扱い、および安定性

- 使用するために再水和するまで、すべての乾燥したプライマーとプローブ、およびポジティブコントロールであるnCoVPCを2～8°Cで保存します。液体HSCコントロール材料は-20°C以下で保管してください。
  注：保管情報は、International ReagentResourceから入手したCDCプライマーおよびプローブ材料に関するものです。市販のプライマーとプローブを使用する場合は、保管と取り扱いについてメーカーの指示を参照してください。
- ご使用前に必ず有効期限をご確認ください。期限切れの試薬は使用しないでください。
- 蛍光発生プローブを光から保護します。
- プライマー、プローブ（アリコートを含む）、および酵素マスターミックスは、調製および使用中は常に解凍し、コールドブロックに保管する必要があります。
- プローブを再凍結しないでください。
- コントロールおよびコントロールのアリコートは、準備および使用中は常に解凍して氷上に保管する必要があります。

検体の収集、取り扱い、保管

不適切または不適切な検体の収集、保管、および輸送は、誤った検査結果をもたらす可能性があります。検体の品質が重要であるため、検体採取のトレーニングを強くお勧めします。CLSI MM13-Aは、適切なリソースとして参照できます。

標本の収集

- COVID-19の臨床検体の収集、取り扱い、および検査に関する暫定ガイドラインを参照してください。https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html
- 適切な収集方法については、検体収集装置の製造元の指示に従ってください。
- 綿棒の標本は、ナイロンやダクロンなどの合成チップを備えた綿棒のみを使用して収集する必要があります®、アルミニウムまたはプラスチックのシャフト。アルギン酸カルシウム綿棒は使用できません。木製のシャフトが付いた綿棒はお勧めしません。ウイルス輸送培地（VTM）などの適切な輸送培地を1～3mL含む滅菌チューブに綿棒をすぐに入れます。

標本の輸送

- 検体は、国際航空運送協会（IATA）の危険物規制の最新版に従って、梱包、出荷、および輸送する必要があります。2019-nCoVの可能性のある検体を送るときは、UN 3373生物物質、カテゴリーBの輸送規制に従ってください。検体は2～8°Cで保管し、アイスパックでCDCに一晩発送します。検体が-70°C以下で凍結している場合は、ドライアイスでCDCに一晩輸送します。

標本の保管

- 検体は採取後2～8°Cで72時間まで保存できます。
- 抽出の遅れが予想される場合は、検体を-70°C以下で保管してください。
- 抽出した核酸は-70°C以下で保存してください。

CDCへの標本紹介

州および地方の公衆衛生研究所の場合：

- すべての検体を一晩CDCに発送します。
- 凍結した標本はドライアイスで、凍結していない標本はコールドパックで発送します。
- ヒトまたは感染の可能性のある生物学的検体の輸送要件については、国際航空運送協会（IATA-www.iata.org）を参照してください。2019-nCoVの可能性のある検体を送るときは、UN 3373生物物質、カテゴリーBの輸送規制に従ってください。
- 出荷する前に、CDCのウイルス性疾患部門（下記の連絡先情報を参照）に検体を送付することを通知してください。
- すべてのサンプルを次の受信者に送信します。

疾病管理予防センター
c / o STATT
注意：ユニット66
1600 Clifton Rd。、Atlanta、GA 30329-4027
電話：（404）639-3931

CDC緊急オペレーションセンター（EOC）の緊急連絡先番号は次のとおりです。
770-488-7100。

試薬とコントロールの準備

注：保管情報は、CDC International ReagentResourceから入手した資料用です。テストに市販の製品を使用する場合は、保管、取り扱い、および準備の手順について、製造元の手順を参照してください。

プライマーとプローブの準備：

1）受領後、乾燥したプライマーとプローブを2～8°Cで保存します。
2）注意事項：これらの試薬は、清潔な場所でのみ取り扱い、暗所で適切な温度（以下を参照）で保管する必要があります。凍結融解サイクルは避ける必要があります。解凍するときは冷たくしてください。
3）無菌操作を使用して、乾燥した試薬を1.5 mLのヌクレアーゼフリー水に懸濁し、暗所で室温で15分間再水和します。
4）穏やかに混合し、プライマー/プローブを300µLの容量で5つの事前にラベル付けされたチューブに分注します。プライマー/プローブの単一の作業アリコートを2～8°Cの暗所で保管します。残りのアリコートを霜のない冷凍庫で≤-20°C。解凍したアリコートを再凍結しないでください（2～8°Cで最大4か月間安定）。

2019-nCoVポジティブコントロール（nCoVPC）の準備：

1）注意事項：この試薬は、汚染の可能性を防ぐために、専用の核酸取り扱いエリアで慎重に取り扱う必要があります。凍結融解サイクルは避ける必要があります。解凍したら氷上で維持します。
2）乾燥した試薬を各チューブに1 mLのヌクレアーゼフリー水に再懸濁して、適切な濃度にします。単回使用のアリコート（約30µL）を作成し、≤-70°Cで保存します。
3）各実験の希釈されたポジティブコントロールの単一アリコートを解凍し、プレートに追加するまで氷上に保持します。アリコートの未使用部分を破棄します。

ヒト検体管理（HSC）（提供されていません）：

1）ヒト検体コントロール（HSC）またはリストされている許容可能な代替抽出コントロールの1つを抽出し、各検体抽出実行で処理する必要があります。
2）使用方法については、ヒト検体管理（HSC）の添付文書を参照してください。

テンプレートコントロールなし（NTC）（提供されていません）：

1）ヌクレアーゼフリーの滅菌水
2）少量のアリコート
3）検体の抽出および/またはプレートのセットアップ中に汚染をチェックするために使用されます

一般的な準備

機器の準備

使用する前に、すべての作業台、ピペット、遠心分離機、およびその他の機器を清掃して除染してください。10%漂白剤、DNAzap™、RNaseAWAYなどの除染剤を使用する必要があります™ 核酸汚染のリスクを最小限に抑えるため。残留漂白剤は70%エタノールを使用して除去する必要があります。

核酸抽出

注：以下の抽出手順は、個々の検体をテストする場合にのみ使用します。標本をプールする場合、変更された抽出手順については付録Bを参照してください。

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのパフォーマンスは、ヒト検体から精製されたテンプレートRNAの量と質に依存します。以下の市販のRNA抽出キットと手順は、パネルで使用するRNAの回収率と純度について認定および検証されています。

Qiagen QIAamp® DSPウイルスRNAミニキットまたはQIAamp® ウイルスRNAミニキット

推奨事項：100µLのサンプルを使用して100µLのバッファーで溶出するか、140µLのサンプルを使用して140µLのバッファーで溶出します。

Qiagen EZ1 Advanced XL

キット：オフボード溶解用のQiagen EZ1 DSPウイルスキットおよびバッファーAVL（別売り）カー
ド：EZ1 Advanced XLDSPウイルスカード
推奨事項：120µLのサンプルを280µLの事前に分注されたバッファーAVLに追加します（入力サンプルの総量は400µLです）。EZ1 AdvancedXLでの抽出を続行します。溶出量は120µLです。

キット：オフボード溶解用のQiagen EZ1ウイルスミニキットv2.0およびバッファーAVL（別売り）カード：
EZ1 AdvancedXLウイルスカード v2.0
推奨事項：120µLのサンプルを280µLの事前に分注されたバッファーAVLに追加します（入力サンプルの総量は400µLです）。EZ1 AdvancedXLでの抽出を続行します。溶出量は120µLです。

Roche MagNA Pure 96

キット：Roche MagNA Pure 96DNAおよびViralNA Small Volume Kit
プロトコル：Viral NA Plasma Ext LysExt Lys SV4.0プロトコルまたはViralNA Plasma Ext Lys SVプロトコル推奨事項：事前に分注された350µLの外部溶解バッファー（別売り）に100µLのサンプルを追加します（入力サンプルの総量は450です）。 µL）。MagNA Pure 96での抽出を続行します。（**内部統制=なし）。** 溶出量は100µLです。

Roche MagNA Pure 24

キット：Roche MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kitプロ
トコル：Pathogen 10002.0プロトコル
推奨事項：100 µLのサンプルを400 µLの事前に分注された外部溶解バッファー（別売り）に追加します（入力サンプルの総量は500 µLです）。MagNA Pure 24での抽出を続行します。（**内部統制=なし）。** 溶出量は100µLです。

PromegaMaxwell®RSC48およびMaxwell®CSC48

キット：PromegaMaxwell®ウイルス全核酸精製キットプ
ロトコル：ウイルス全核酸
推奨事項：120 µLのサンプルを330 µLの事前に分注した外部溶解バッファー（300 µLの溶解バッファーと30 µLのProteinase K、キットに付属）に追加します（総入力量は450 µLです）。
Maxwell®RSC48での抽出を続行します。溶出量は75µLです。

以下の抽出プラットフォームの同等性とパフォーマンスは、CDCヒトインフルエンザウイルスリアルタイムRT-PCR診断パネル（K190302）で実証され、それらのデータに基づいて、CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでの使用が許容されます。 。

QIAGEN QIAcube

キット：QIAGENQIAamp®DSPウイルスRNAミニキットまたはQIAamp®ウイルスRNAミニ

キット推奨事項：140µLのサンプルを使用し、100µLのバッファーで溶出します。

ロシュマグナピュアLC

キット：Roche MagNA Pure Total Nucleic Acidキットプ

ロトコル：Total NA External_lysis

推奨事項：100µLのサンプルを300µLの事前に分注されたTNA分離キット溶解バッファーに追加します（総入力サンプル量は400µLです）。溶出量は100µLです。

ロシュMagNAピュアコンパクト

キット：Roche MagNA純粋な核酸分離キットIプロト

コル：Total_NA_Plasma100_400

推奨事項：100µLのサンプルを300µLの事前に分注されたTNA分離キット溶解バッファーに追加します（総入力サンプル量は400µLです）。溶出量は100µLです。

bioMérieuxNucliSENS®easyMAG®Instrument

プロトコル：「オフボード溶解」試薬設定を使用する一般的なプロトコル（血液用ではありません）。推奨事項：100µLのサンプルを1000µLの事前に分注されたeasyMAG溶解バッファーに追加します（入力サンプルの総量は1100µLです）。室温で10分間インキュベートします。溶出量は100µLです。

bioMérieuxEMAG®Instrument

プロトコル：カスタムプロトコル： **CDCインフルエンザV1** 「オフボード溶解」試薬設定を使用します。推奨事項：100µLのサンプルを2000µLの事前に分注されたeasyMAG溶解バッファーに追加します（入力サンプルの総量は2100µLです）。室温で10分間インキュベートします。溶出量は100µLです。カスタムプロトコル、**CDCインフルエンザV1、** bioMérieuxEMAGでプログラムされています® ビオメリューのサービス担当者の支援を受けた機器。インストールの検証は、インストール時に文書化されます。ラボでは、bioMérieuxカスタムプロトコルのインストール手順の段階的な検証の記録を保持することをお勧めします。

メーカーの推奨手順（上記の推奨事項に記載されている場合を除く）は次のとおりです。
サンプル抽出のために続いた。HSCは各抽出バッチに含まれている必要があります。

免責事項：ベンダーまたはメーカーの名前は、適切な製品ソースの例として提供されています。含めることは、疾病管理予防センターによる承認を意味するものではありません。

アッセイのセットアップ

反応マスターミックスとプレートのセットアップ

注：プレートのセットアップ構成は、検体の数と作業日の構成によって異なる場合があります。NTCとnCoVPCを各実行に含める必要があります。

1）試薬セットアップルームのクリーンフードに、rRT-PCRバッファー、酵素、およびプライマー/プローブを氷上またはコールドブロック上に置きます。準備および使用中は冷たくしてください。

2）バッファー、酵素、プライマー/プローブを5回反転させて混合します。

3）試薬とプライマー/プローブを5秒間遠心分離してチューブの底に内容物を集め、チューブをコールドラックに置きます。

4）プライマー/プローブセットごとに1本の1.5mLマイクロ遠心チューブにラベルを付けます。

5）アッセイごとに設定する反応の数（N）を決定します。NTC、nCoVPC、HSC（rRT-PCRの実行に含まれている場合）、RP反応、およびピペッティングエラーのために過剰な反応ミックスを作成する必要があります。次のガイドを使用してNを決定します。

- コントロールを含むサンプル数（n）が1から14に等しい場合、N = n + 1
- コントロールを含むサンプル数（n）が15以上の場合、N = n + 2

6）プライマー/プローブセットごとに、それぞれに追加する各試薬の量を計算します反応混合物（N =反応数）。

ThermoFisherTaqPath™1ステップRT-qPCRマスターミックス

ステップ #	試薬	巻 試薬の追加 反応ごと
1	ヌクレアーゼフリーウォーター	N x 8.5 µL
2	プライマー/プローブミックスTaqPathの組み合わせ™1ス	N x 1.5 µL
3	テップRT-qPCRマスターミックス（4x）	N x 5.0 µL
	全容積	**N x 15.0 µL**

PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム

ステップ #	試薬	巻 試薬の追加 反応ごと
1	ヌクレアーゼフリーウォーター	N x 3.1 µL
2	プライマー/プローブミックスの組み合わせ	N x 1.5 µL
3	GoTaqプローブqPCRマスターミックスと	N x 10.0 µL
4	dUTPGo Script RT Mix for 1-Step RT-qPCR	N x 0.4 µL
	全容積	**N x 15.0 µL**

NSuantabioqScriptXLTワンステップRT-qPCRToughMix

ステップ #	試薬	巻 試薬の追加 反応ごと
1	ヌクレアーゼフリーウォーター	N x 3.5 µL
2	プライマー/プローブミックスの組み合わせ	N x 1.5 µL
3	qScriptXLTワンステップRT-qPCRToughMix（2X）	N x 10.0 µL
	全容積	**N x 15.0 µL**

QuantabioUltraPlex 1ステップToughMix（4X）

ステップ #	試薬	巻 試薬の追加 反応ごと
1	ヌクレアーゼフリーウォーター	N x 8.5 µL
2	プライマー/プローブミックスUltraPlex1ス	N x 1.5 µL
3	テップToughMix（4X）の組み合わせ	N x 5.0 µL
	全容積	**N x 15.0 µL**

7）それぞれのラベルが貼られた1.5mLマイクロ遠心チューブに試薬を分注します。試薬を加えた後、上下にピペッティングして反応混合物を混合します。***ボルテックスしないでください。***

8）5秒間遠心分離してチューブの底に内容物を集め、チューブをコールドラックに置きます。

9）反応ストリップチューブまたはプレートを96ウェルクーラーラックに設置します。

10）15 µLの各マスターミックスを、図のように列を横切る適切なウェルに分注します。下 （**図1**）**：**

フィグre 1：の例 ReactioNS マストrミックスプレートのセットアップ

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
NS	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
NS	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
NS	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
NS												
E												
NS												
NS												
NS												

11）核酸処理エリアに移動する前に、アッセイ準備エリアのカラム＃1のテンプレートなしコントロール（NTC）反応を準備します。

12）5 µLのヌクレアーゼフリー水をNTCサンプルウェルにピペットで入れます（**図2**、 列1）。続行する前に、NTCウェルにしっかりとキャップを付けてください。

13）反応プレート全体を覆い、反応プレートを検体の核酸処理エリアに移動します。

核酸テンプレートの追加

1）核酸サンプルチューブを約5秒間静かにボルテックスします。

2）5秒間遠心分離して、チューブの底に内容物を集めます。

3）遠心分離後、抽出した核酸サンプルチューブをコールドラックに入れます。

4）サンプルは、以下に示すようにテストされている特定のアッセイの2～11列目（1列目と12列目はコントロール用）に追加する必要があります。 **図2。** 最初のサンプル5.0µLを、そのサンプルのラベルが付いたすべてのウェルに注意深くピペットで入れます（つまり、サンプル「S1」の列＃2）。 *追加中は、他のサンプルウェルを覆っておいてください。追加するたびにヒントを変更してください。*

5）クロスコンタミネーションを防ぎ、サンプルの追跡を確実にするために、サンプルが追加されたカラムにしっかりとキャップを付けます。

6）汚染を避けるために、頻繁に、必要に応じて手袋を交換してください。

7）残りのサンプルに対してステップ＃4と＃5を繰り返します。

8）必要に応じて、5 µLのHuman Specimen Control（HSC）抽出サンプルをHSCウェルに追加します（**図2、** 列11）。添加後、ウェルにしっかりと蓋をします。注：CLIA規制に従い、HSCは少なくとも1日に1回テストする必要があります。

9）リアクションプレート全体を覆い、リアクションプレートをポジティブテンプレートコントロールハンドリングエリアに移動します。

<u>アッセイコントロールの追加</u>

1）5 µLのnCoVPCRNAをカラム12のサンプルウェルにピペットで移します（**図2）。** コントロールRNAを加えた後、ウェルにしっかりとキャップをします。

ノート： *<u>8チューブのストリップを使用</u>する場合は、各ストリップのTABにラベルを付けて、サンプルの位置を示します。*

反応チューブの上部にラベルを付けないでください！

2） 反応チューブストリップを10～15秒間簡単に遠心分離します。遠心分離後、冷に戻しますラック。

ノート： *<u>96ウェルプレートを使用する</u>場合は、プレートを500 xg、4で30秒間遠心分離します。°° NS。*

フィグre 2. 2019-nCoV rRT-PCNS 診断オスティックパネル：例 サンプルおよび制御の設定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11NS	12
NS	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
NS	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
NS	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
NS												
E												
NS												
NS												
NS												

NS必要に応じて、この列のサンプルを抽出されたHSCに置き換えます

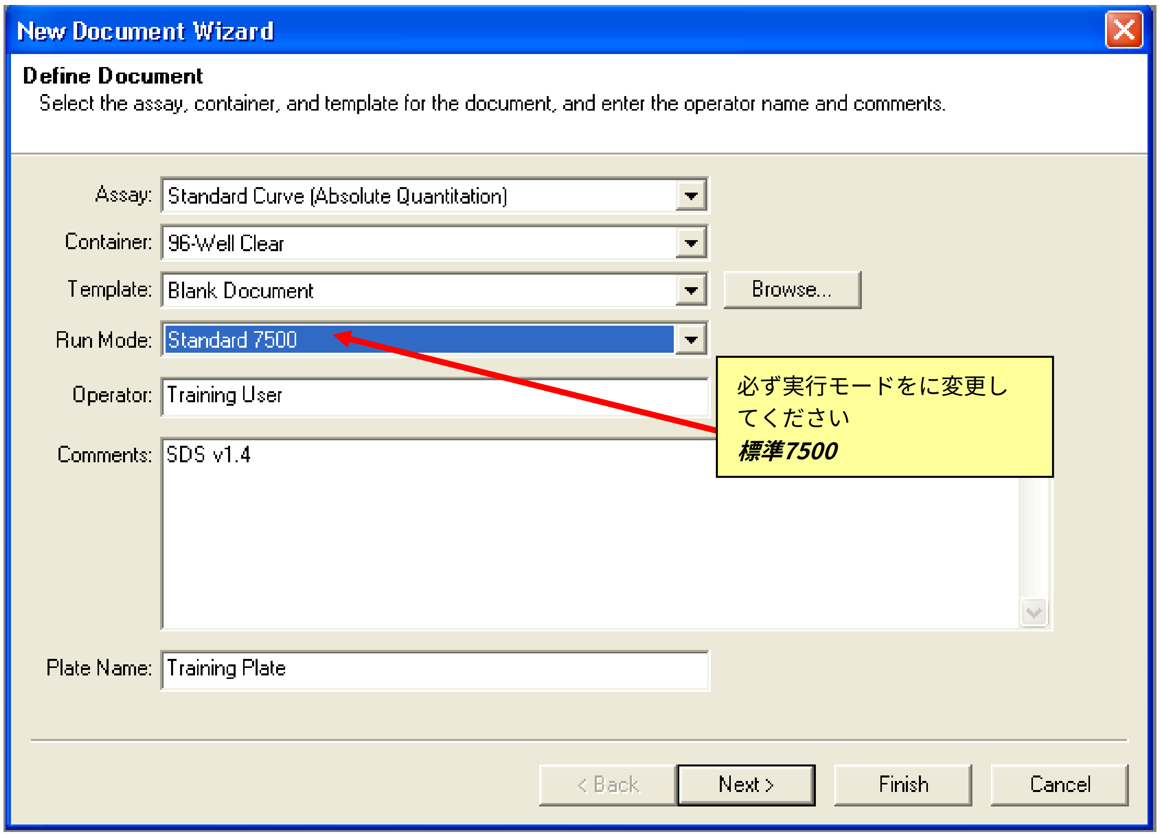
Applied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCRで実行テンプレートを作成します計測器（テンプレートが存在しない場合に必要）

テンプレートがすでに計測器に存在する場合は、に進んでください。 **テストの実行** セクション。

1）デスクトップのApplied Biosystems 7500 Fast Dx Systemアイコンをダブルクリックして、Applied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCR装置を起動します。

2）新しいウィンドウが表示されたら、を選択します **新しいドキュメントを作成する** メニューから。

図3.新しいドキュメントウィザードウィンドウ



3） **新しいドキュメントウィザード** スクリーンイン **図3** 現れる。選択する：

NS。アッセイ：**標準曲線（絶対定量）**

NS。容器：**96-よくクリア**

NS。レンプレート：**空白のドキュメント**

NS。実行モード：**標準7500**

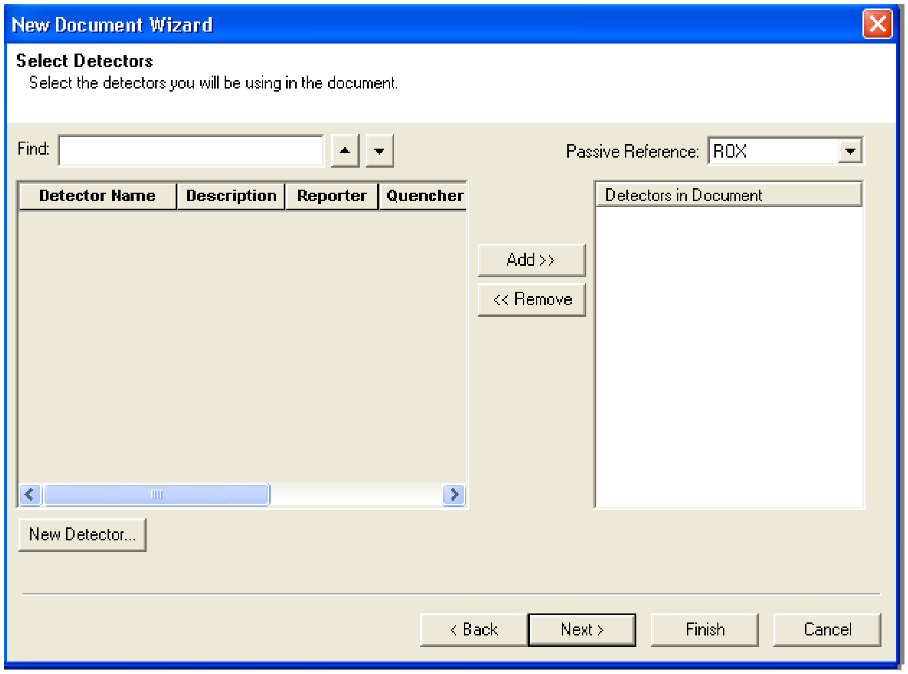
e。オペレーター：***あなたの名前***

NS。コメント：**SDS v1.4**

NS。プレート名：***あなたの選択***

4）選択した後、をクリックします **次** ウィンドウの下部にあります。

図4.新しい検出器の作成



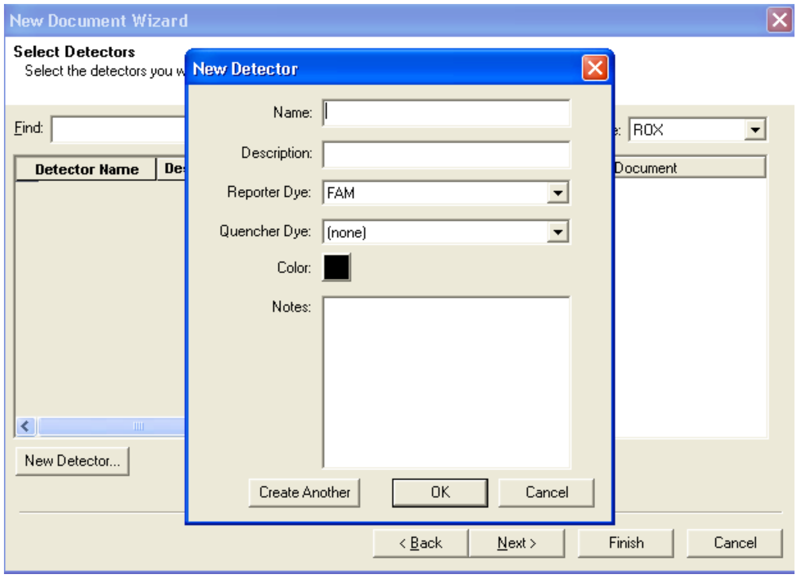
注：ROXはデフォルトのパッシブリファレンスです。これは、手順12で「なし」に変更されます。

5）次を選択した後、 ***検出器を選択*** 画面（**図4**） 現れる。

6）をクリックします **新しい検出器** ボタン（を参照） **図4**）。

7） **新しい検出器** ウィンドウが表示されます（**図5**）。 プライマーとプローブのセットごとに新しい検出器を定義する必要があります。これらの検出器を作成すると、反応の最後に各プライマーとプローブセットを個別に分析できます。

図5.新しい検出器ウィンドウ



8）N1検出器を作成することから始めます。以下のものが含まれます：

NS。名前：**N1**

NS。説明：*空白のままにする*

NS。レポーター染料：**FAM**

NS。クエンチャー染料:(**なし**)

e。色：*検出器インジケータの色を変更するには、次の手順を実行します。*

⇒ カラースクエアをクリックして、カラーチャートを表示します

⇒ 正方形の1つをクリックして色を選択します

⇒ 色を選択した後クリック **わかった** 新しい検出器画面に戻るには

NS。クリック**わかった** [新しい検出器]画面のボタンをクリックして、に示す画面に戻ります。 **図4。**

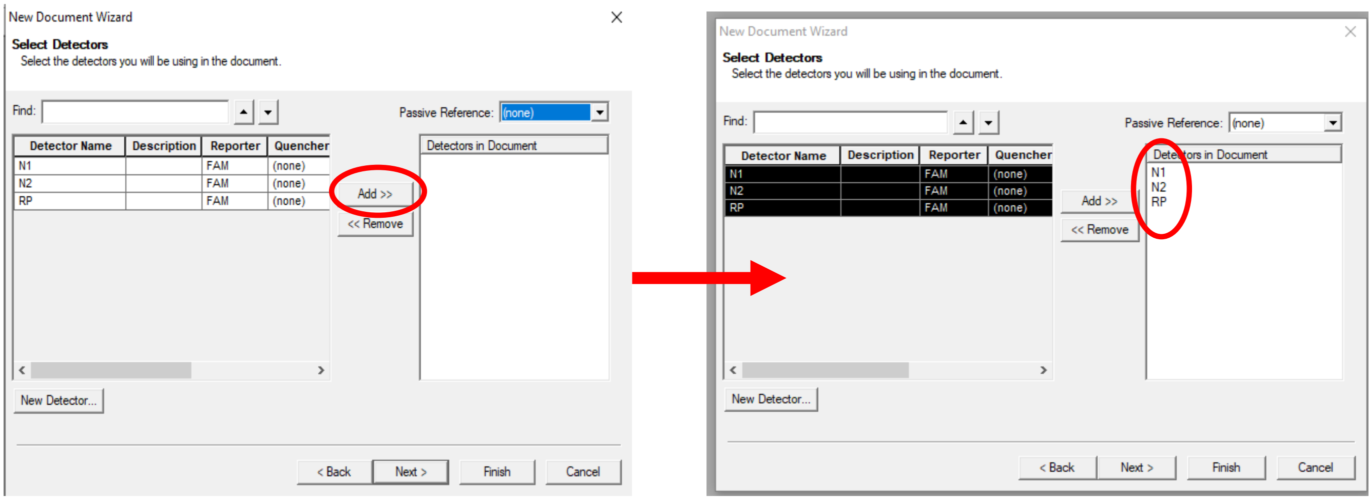
9）パネル内のターゲットごとに手順6〜8を繰り返します。

名前	レポーター染料	クエンチャー染料
N1	FAM	（なし）
N2	FAM	（なし）
RP	FAM	（なし）

10）各検出器が追加された後、 **検出器の名前、説明、レポーター** と **クエンチャー** フィールドはに入力されます **検出器を選択** 画面（**図6**）。

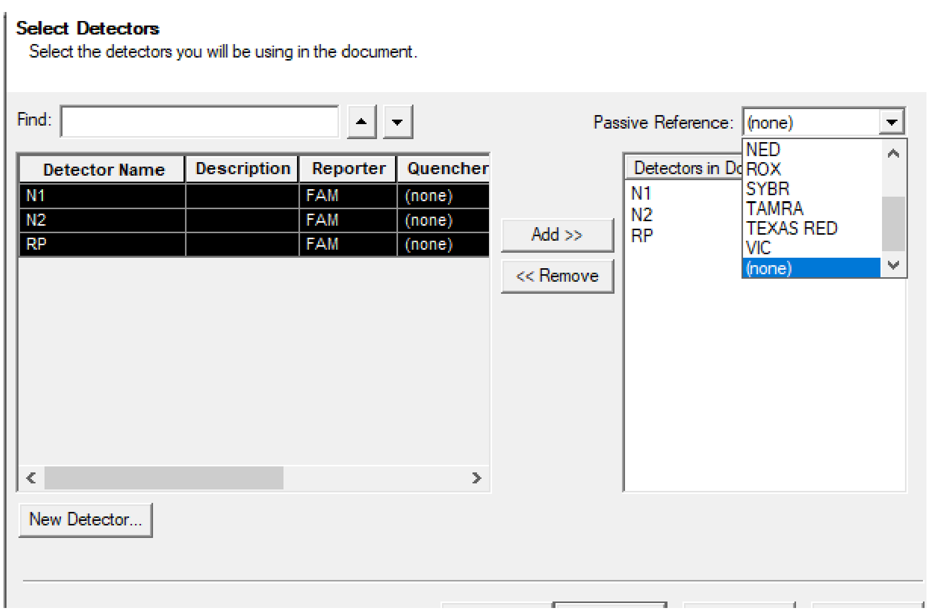
11）先に進む前に、新しく作成した検出器をドキュメントに追加する必要があります。ドキュメントに新しい検出器を追加するには、をクリックします**追加** （見る **図6**）。 検出器の名前は、の右側に表示されます **検出器を選択** 窓 （**図6**）。

図6.ドキュメントへの新しい検出器の追加



12）すべての検出器が追加されたら、（**なし**） にとって **パッシブリファレンス** 右上のドロップダウンメニュー（**図7**）。

図7.パッシブリファレンスの選択



上記のように、パッシブ参照は「（なし）」に設定する必要があります。

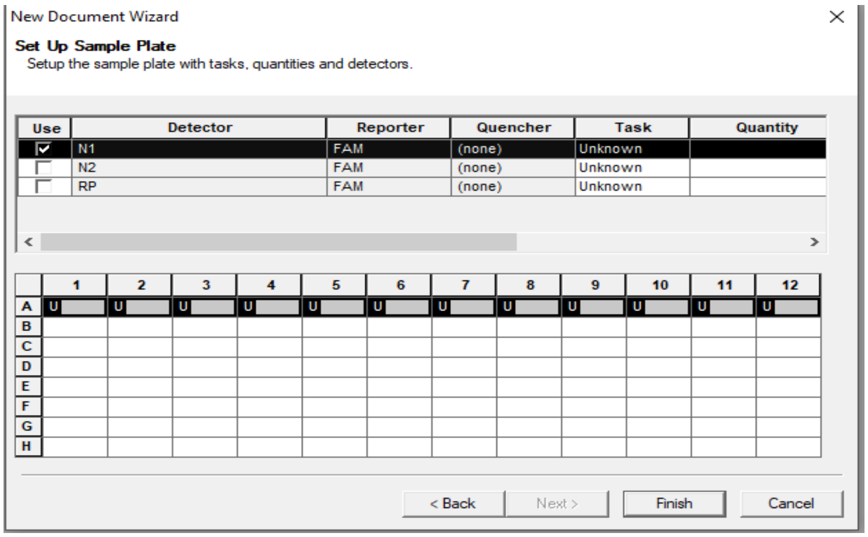
13）クリック **次** の下部に **検出器を選択** に進むためのウィンドウ **サンプルプレートのセットアップ** 窓 （**図8）。**

14）で **サンプルプレートのセットアップ** 窓 （**図8）、** マウスを使用して、スプレッドシートのウィンドウの下部から行Aを選択します（を参照）。 **図8）。**

15）ウィンドウの上部で、検出器を選択します **N1。** 選択した検出器の横にチェックが表示されます（**図8）。** また、スプレッドシートの行には、選択した検出器を示す色付きの「U」アイコンが表示されます。

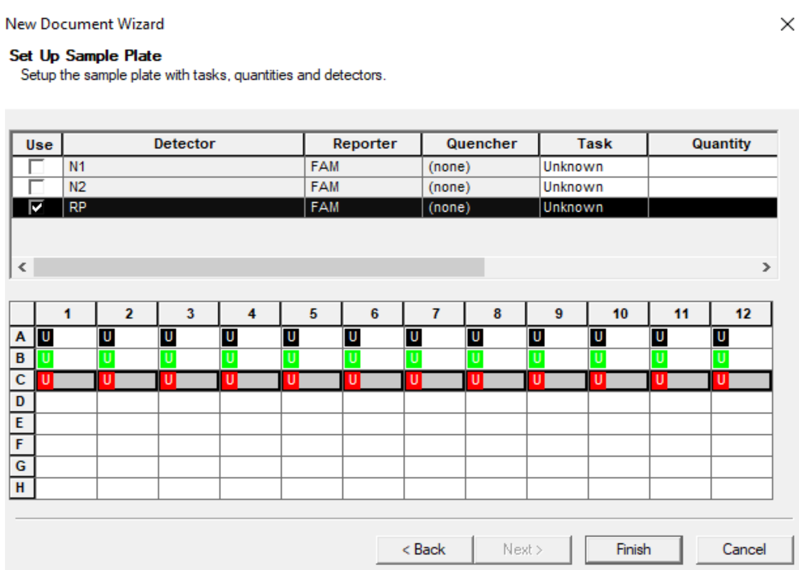
16）アッセイで使用する検出器ごとにステップ14〜15を繰り返します。

図8.サンプルプレートのセットアップ



17）選択 **終了** 検出器がそれぞれの行に割り当てられた後。（（**図9）。**

図9.完成したプレートのセットアップ

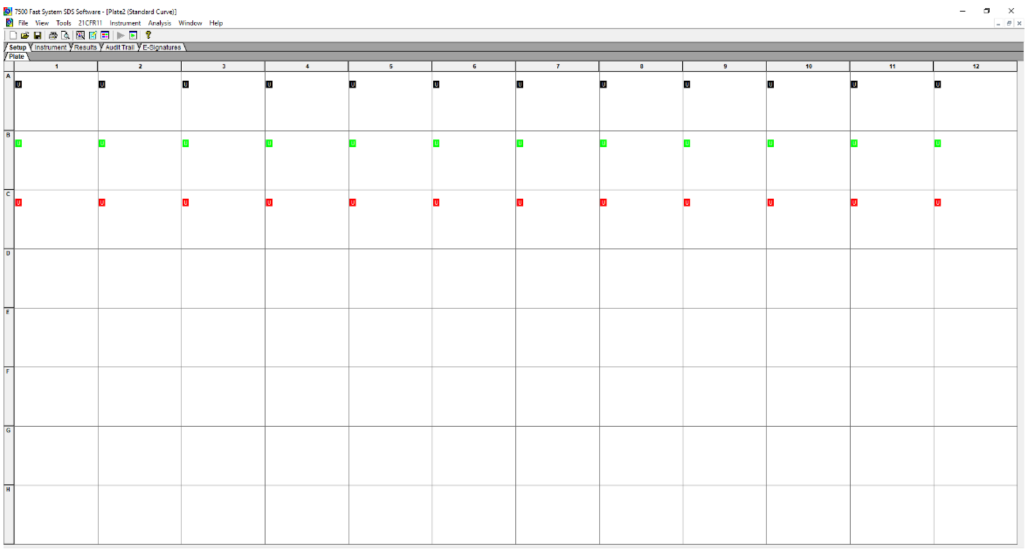


18）「完了」をクリックした後、Applied Biosystems 7500 FastDxを初期化するための短い一時停止があります。この初期化の後にクリックノイズが続きます。***注：初期化するには、マシンの電源をオンにする必要があります。***

19）初期化後、 **皿** セットアップのタブ（**図10**） 現れる。

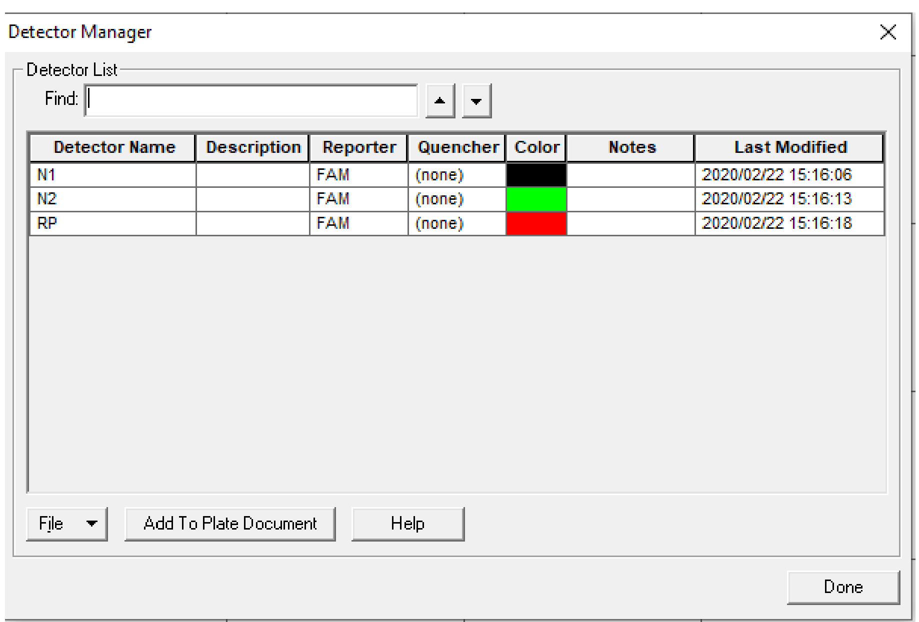
20）プレートの各ウェルには、以前に選択した検出器ラベルに対応する色付きのUアイコンが含まれている必要があります。検出器の割り当てを確認するには、**ツール** ファイルメニューから、次に、 **検出器マネージャー。図10.**

プレートセットアップウィンドウ



21）Detector Managerウィンドウが表示されます（**図11**）。

図11.DetectorManagerウィンドウ



22）すべての検出器が含まれていること、および各ターゲットに **レポーター** に設定 **FAM** そしてその **クエンチャー** に設定されています （**なし**）。

23）すべての検出器が存在する場合は、 **終わり。** 検出器情報が作成され、プレート上のウェルに割り当てられました。

機器設定の定義

1）検出器を作成して割り当てたら、機器のセットアップに進みます。

2）を選択します **楽器** タブで熱サイクル条件を定義します。

3）サーマルサイクリング条件を次のように変更します（**図12）：**

サーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス、CG

NS。ステージ1では、2分に設定します。**25°C; 1担当者**

NS。ステージ2では、15分に設定します。**50°C; 1担当者**

NS。ステージ3では、2分に設定します。**95°C、1回**

NS。ステージ4では、ステップ1を次のように設定します。**3秒** で **95°C。**

e。ステージ4では、ステップ2を次のように設定します。**30秒** で **55.0°C。**

NS。ステージ4では、担当者を次のように設定する必要があります**45。**

NS。下**設定（図12）、** 左下のボックスで、容量を20 µLに変更します。

NS。下**設定、実行モード** 選択する必要があります **標準7500。**

NS。ステージ4のステップ2は、データ収集を示すために黄色で強調表示する必要があります（を参照）。**形12）。**

また

Quantabio qScript™ XLTワンステップRT-qPCRToughMixまたはUltraPlexワンステップToughMix（4X）

NS。ステージ1では、**50°C; 1担当者**

NS。ステージ2では、3分に設定します。**95°C、1回**

NS。ステージ3では、ステップ1を次のように設定します。**3秒** で **95°C。**

NS。ステージ3では、ステップ2を次のように設定します。**30秒** で **55.0°C。**

e。ステージ3では、担当者を次のように設定する必要があります**45。**

NS。下**設定（図12）、** 左下のボックスで、容量を20 µLに変更します。

NS。下**設定、実行モード** 選択する必要があります **標準7500。**

NS。ステージ3のステップ2は、データ収集を示すために黄色で強調表示する必要があります（を参照）。**形12）。**

また

PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム

NS。ステージ1では、15分に設定します。**45°C; 1担当者**

NS。ステージ2では、2分に設定します。**95°C、1回**

NS。ステージ3では、ステップ1を次のように設定します。**3秒** で **95°C。**

NS。ステージ3では、ステップ2を次のように設定します。**30秒** で **55.0°C。**

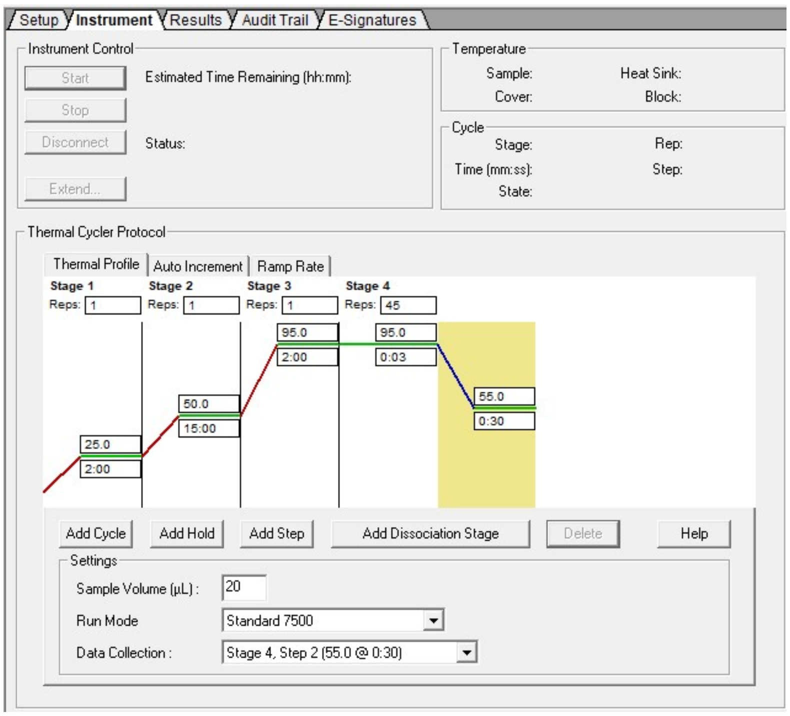
e。ステージ3では、担当者を次のように設定する必要があります**45。**

NS。下**設定（図12）、** 左下のボックスで、容量を20 µLに変更します。

NS。下**設定、実行モード** 選択する必要があります **標準7500。**

NS。ステージ3のステップ2は、データ収集を示すために黄色で強調表示する必要があります（を参照）。**形 12）。**

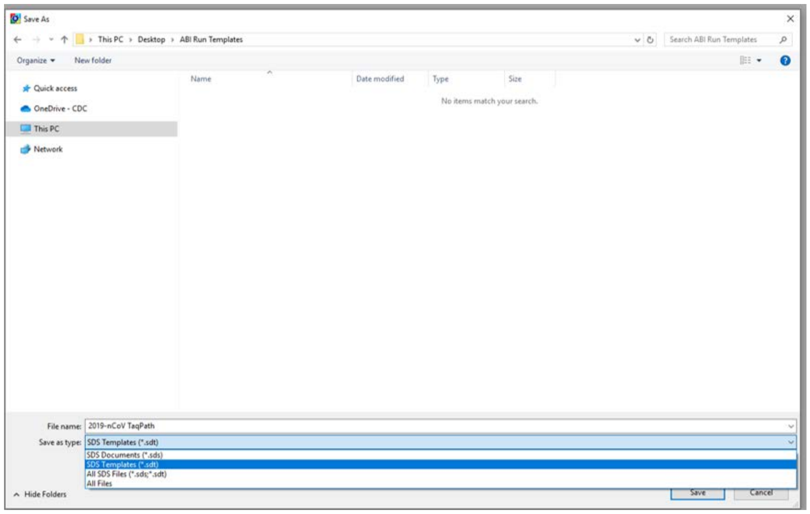
図12.機器ウィンドウ



4）に変更を加えた後 **楽器** タブをクリックすると、テンプレートファイルを保存する準備が整います。テンプレートを保存するには、**ファイル** トップメニューから、を選択します **名前を付けて保存。** 酵素オプションは機器の設定が異なるため、酵素オプションを示す名前でテンプレートを保存することをお勧めします。

5）テンプレートを次のように保存します **2019-nCoV Dx Panel TaqPath** また **2019-nCoV Dx Panel Quanta** また **2019-nCoV Dx Panel Promega** 必要に応じて、「***ABI実行テンプレート***」（*このフォルダを作成する必要があります）。* タイプとして保存はSDSテンプレート（* .sdt）（**図13）。**

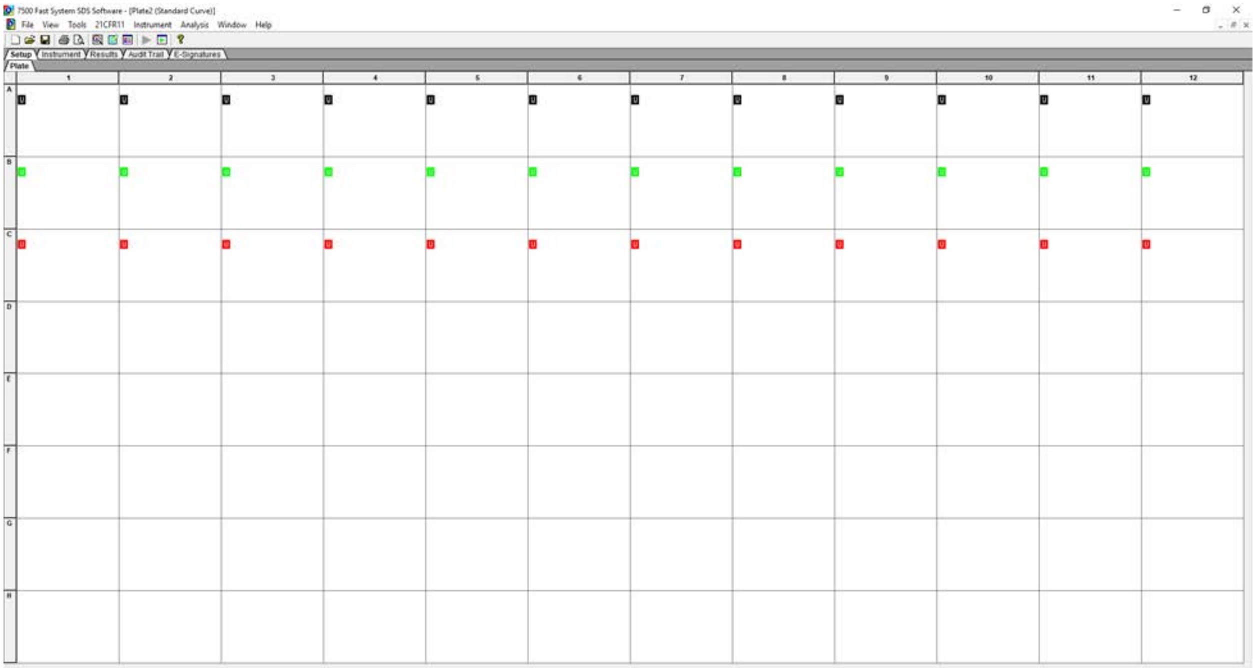
図13.テンプレートの保存



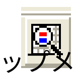
テストの実行

1）ABI 7500 FastDxリアルタイムPCR装置の電源を入れます。
2）デスクトップの7500 Fast Dx Systemアイコンをダブルクリックして、Applied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCRシステムを起動します。
3）新しいウィンドウが表示されたら、を選択します **既存のドキュメントを開く** メニューから。
4）デスクトップからABI RunTemplateフォルダーに移動して選択します。
5）適切なテンプレートファイルをダブルクリックします（**2019-nCoV Dx Panel TaqPath** または **2019-nCoV Dx パネルクォンタ** または **2019-nCoV Dx Panel Promega**）
6）Applied Biosystems 7500 FastDxリアルタイムPCR装置を初期化できるように少し休止します。この初期化の後にクリックノイズが続きます。***注：初期化するには、マシンの電源をオンにする必要があります。***

図14.プレートセットアップウィンドウ



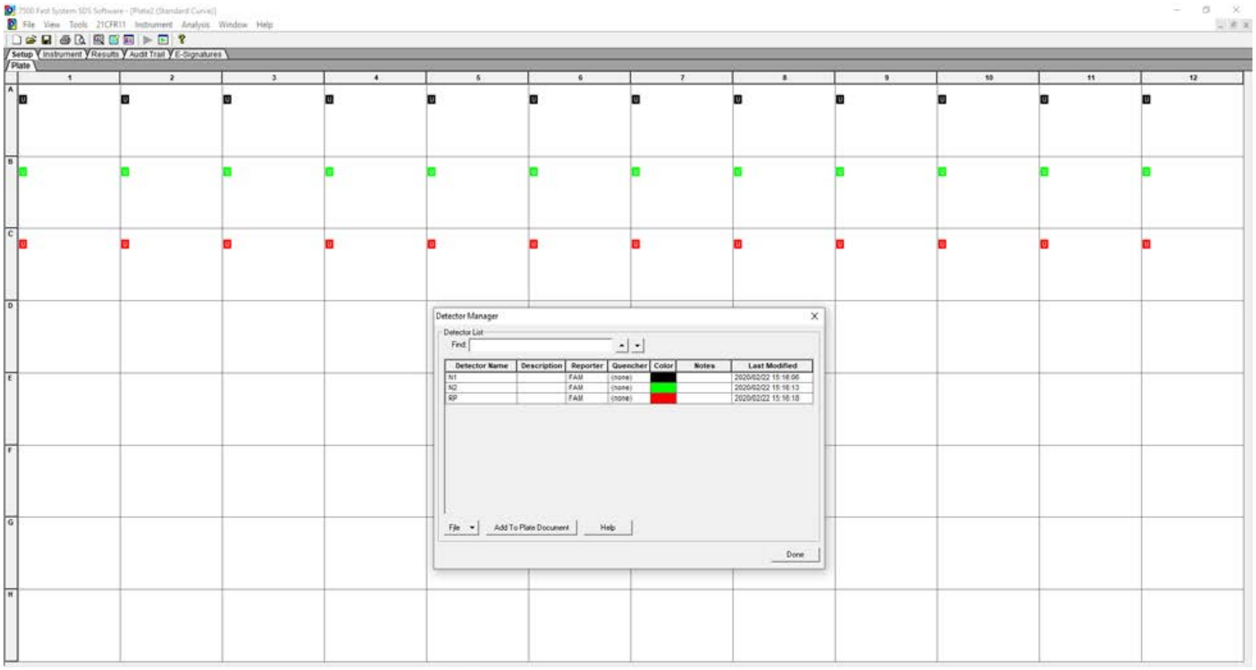
7）機器の初期化後、プレートマップが表示されます（**図14**）**。** 検出器とコントロールは、元のテンプレートで割り当てられたとおりにすでにラベル付けされている必要があります。

8）をクリックします **井戸検査官** トップメニューのアイコン。

9）プレートマップ上で目的の検体ウェルを強調表示します。

10）サンプル識別子を次のように入力します **サンプル名** のボックス **井戸検査官** 窓 （**図15**）**。**

図15.ウェルのラベル付け



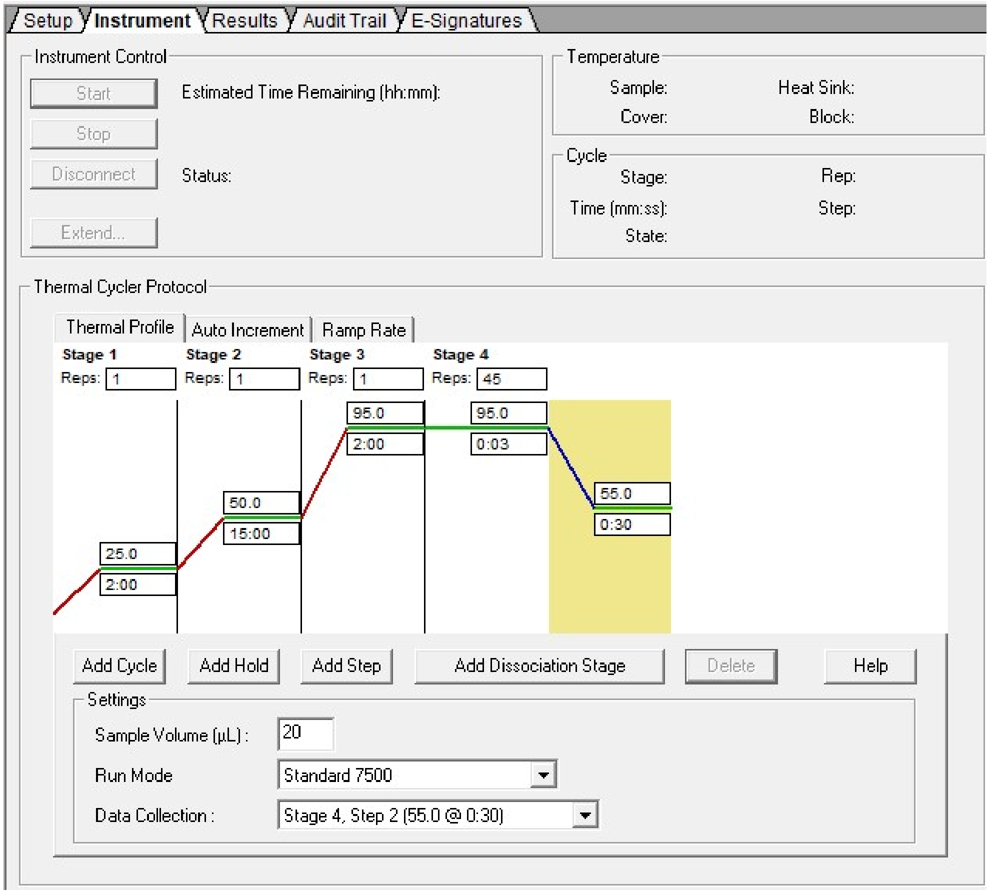
11）すべてのサンプル識別子がプレート設定に追加されるまで、手順9～10を繰り返します。

12）すべての標本およびコントロール識別子が追加されたら、をクリックします。 **選ぶ** のボタン **井戸検査官** に戻るウィンドウ **皿** タブを設定します。

13）をクリックします **楽器** 左上隅のタブ。

14）7500反応の反応条件、量、およびタイプはすでにロードされている必要があります（**形 16）。**

図16.機器の設定



15）設定が正しいことを確認します（ *機器設定の定義）。*

16）続行する前に、実行ファイルを保存する必要があります。メインメニューから、**ファイル、** それから **名前を付けて保存。** 適切な実行フォルダ指定で保存します。

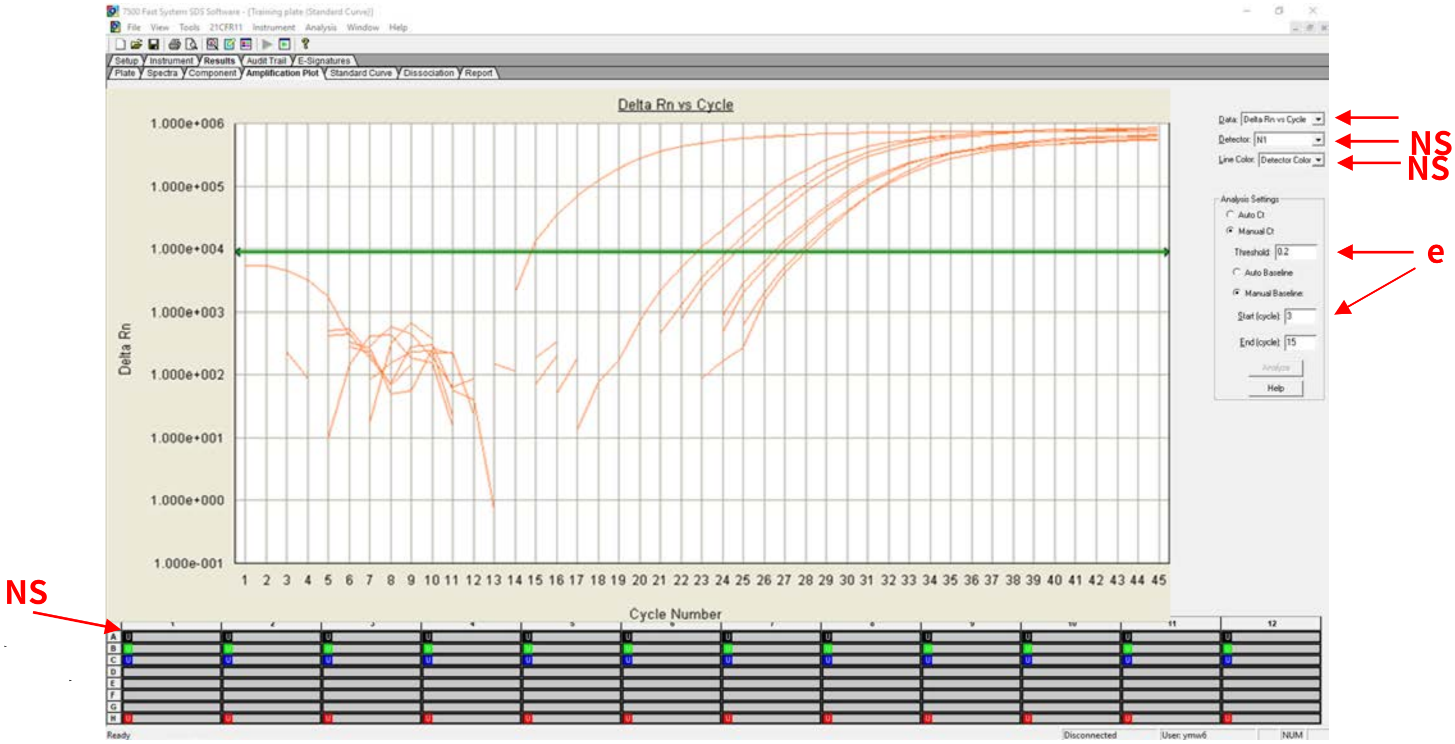
17）プレートを機器のプレートホルダーにロードします。プレートがホルダー内で適切に位置合わせされていることを確認してください。

18）実行ファイルが保存されたら、をクリックします。 **始める** ボタン。 *注：実行が完了するまでに約1時間20分かかります。*

データ分析

1）実行が完了したら、 **結果** ソフトウェアの左上隅にあるタブ。
2）を選択します **増幅プロット** 生データを表示するタブ（**図17**）。

図17.増幅プロットウィンドウ



3）実行からのすべてのサンプルを強調表示することから始めます。これを行うには、左上のボックスをクリックします（（NS）サンプルウェルの（**図17**）。 すべての成長曲線がグラフに表示されます。

4）ウィンドウの右側 （（NS）、NS **データ** ドロップダウンの選択は次のように設定する必要があります **デルタRn対サイクル。**

5）選択 **N1** から （（NS）、NS **検出器** 下向き矢印を使用して、メニューをドロップダウンします。

NS。各プライマーとプローブセットの異なる性能プロファイルを反映するために、各検出器は個別に分析されることに注意してください。

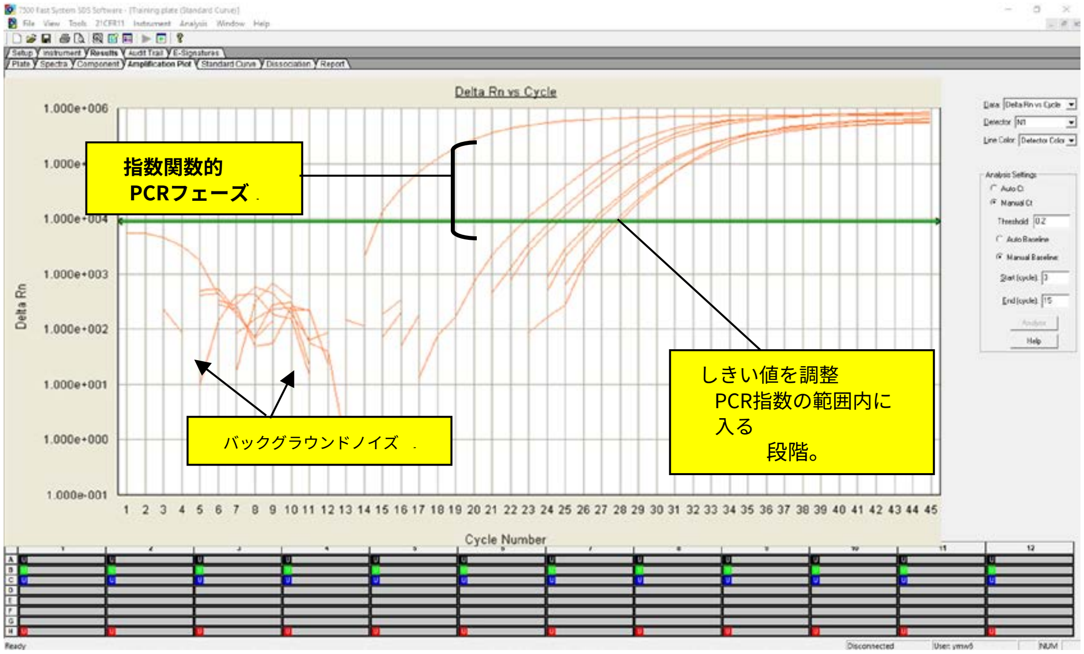
6）で **線の色** 落ちる （（NS）、 **検出器の色** 選択する必要があります。

7）下 **分析設定** 選択する **マニュアルCt** （e）。

NS。 変更しないでください **手動ベースライン** デフォルトの番号。

8）マウスを使用して、赤いしきい値線をクリックして、蛍光曲線の指数関数的位相内でバックグラウンド信号の上に来るまでドラッグします（**図18**）。

図18.増幅プロット



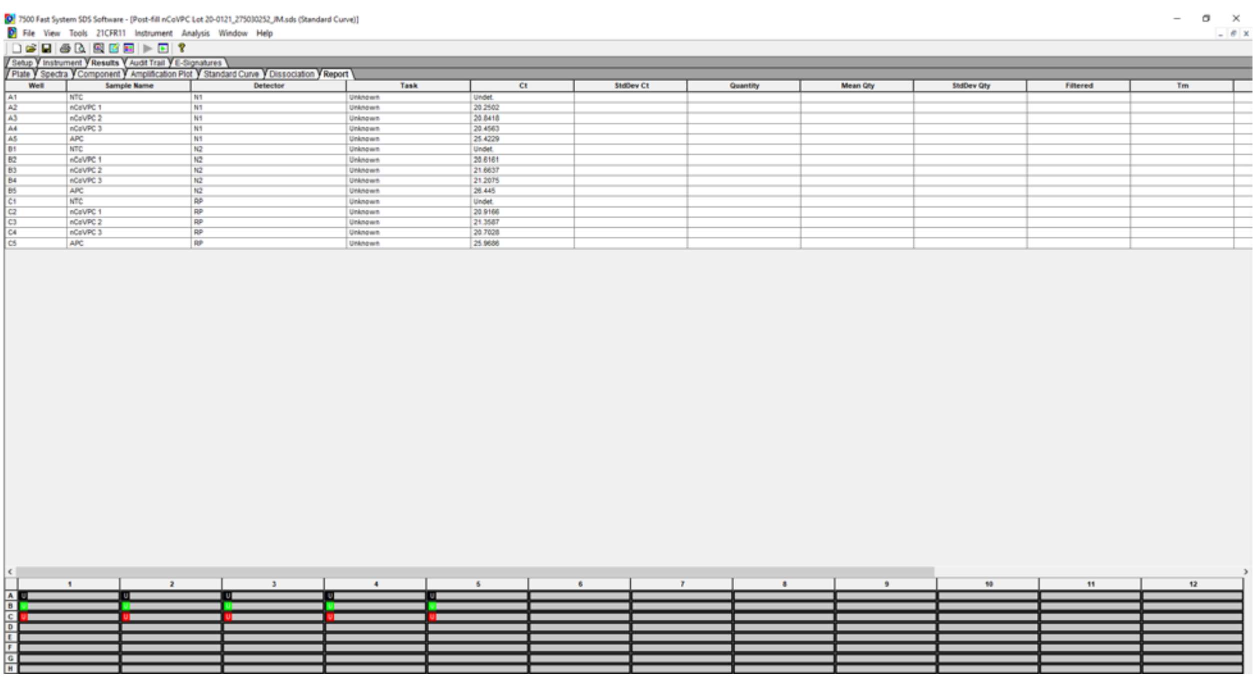
9）をクリックします **分析する** ウィンドウの右下隅にあるボタン。赤いしきい値線が緑に変わり、データが分析されたことを示します。

10）ステップ5〜9を繰り返して、マーカーの各セット（N1、N2、RP）に対して生成された結果を分析します。

11）を選択して分析ファイルを保存します **ファイル** それから **名前を付けて保存** メインメニューから。

12）各マーカーの分析が完了したら、 **報告** グラフの上にあるタブでCt値を表示します（**図19）**。 昇順または降順のサンプル名でレポートをフィルタリングするには
注文するには、クリックするだけです **サンプル名** テーブルで。

図19.レポート



Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	NTC	N1	Unknown	Undet.						
A2	nCoVPC 1	N1	Unknown	20.2502						
A3	nCoVPC 2	N1	Unknown	20.8418						
A4	nCoVPC 3	N1	Unknown	20.4563						
A5	APC	N1	Unknown	25.4229						
B1	NTC	N2	Unknown	Undet.						
B2	nCoVPC 1	N2	Unknown	20.8161						
B3	nCoVPC 2	N2	Unknown	21.6637						
B4	nCoVPC 3	N2	Unknown	21.2075						
B5	APC	N2	Unknown	26.445						
C1	NTC	RP	Unknown	Undet.						
C2	nCoVPC 1	RP	Unknown	20.9166						
C3	nCoVPC 2	RP	Unknown	21.3587						
C4	nCoVPC 3	RP	Unknown	20.7028						
C5	APC	RP	Unknown	25.9686						

結果の解釈と報告

抽出とポジティブコントロールの結果と解釈テンプレートコントロールなし（NTC）

NTCは、RNAの代わりにヌクレアーゼフリーの水をrRT-PCR反応に使用することで構成されています。すべてのプライマーおよびプローブセットのNTC反応は、しきい値ラインを超える蛍光増殖曲線を示すべきではありません。NTC反応のいずれかがサイクルしきい値を超える成長曲線を示す場合は、サンプルの汚染が発生している可能性があります。実行を無効にし、ガイドラインを厳守してアッセイを繰り返します。

2019-nCoVポジティブコントロール（nCoVPC）

nCoVPCは、invitroで転写されたRNAで構成されています。nCoVPCは、次のプライマーおよびプローブセットで陽性の結果をもたらします：N1、N2、およびRP。

ヒト検体管理（HSC）（抽出管理）

HSCがCDC2019-nCoV rRT-PCR診断パネル（アッセイのセットアップに関する前のセクションを参照）で実行される場合、HSCは、核酸の回収の成功と抽出試薬の完全性を実証するための核酸抽出手順コントロールとして使用されます。HSCコントロールは、非感染性の培養ヒト細胞（A549）材料で構成されています。HSCから精製された核酸は、RPプライマーとプローブセットで陽性の結果をもたらし、すべての2019-nCoVマーカーで陰性の結果をもたらすはずです。

CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルに含まれるコントロールの期待されるパフォーマンス

コントロール タイプ	外部の コントロール 名前	慣れている モニター	2019年 nCoV_N1	2019年 nCoV_N2	RP	期待されるCt 値
ポジティブ	nCoVPC	実質的 試薬の故障 含む プライマーと プローブの完全性	+	+	+	<40.00 Ct
ネガティブ	NTC	試薬および/または 環境 汚染	-	-	-	なし 検出されました
抽出	HSC	溶解の失敗 と抽出 手順、 潜在的な 汚染 その間 抽出	-	-	+	<40.00 Ct

上記のコントロールのいずれかが説明されている期待されるパフォーマンスを示さない場合、アッセイが不適切に設定および/または実行されたか、試薬または機器の誤動作が発生した可能性があります。実行を無効にして、再テストします。

RNase P（抽出制御）

すべての臨床サンプルは、40.00サイクル（<40.00 Ct）以内にしきい値ラインを超えるRNase P反応の蛍光増殖曲線を示す必要があります。これは、ヒトRNaseP遺伝子の存在を示しています。臨床検体でRNasePを検出できない場合は、次のことを示している可能性があります。

- 臨床材料からの核酸の不適切な抽出は、RNAの喪失および/または RNA分解。
- 検体の採取不良または喪失による十分なヒト細胞物質の欠如 威厳。
- 不適切なアッセイのセットアップと実行。
- 試薬または機器の故障。

RPアッセイでヒトの臨床検体に対して陽性の結果が得られない場合は、次のように解釈してください。

- 2019-nCoV N1およびN2が正のRPがなくても正の場合、結果は 有効と見なす必要があります。元の臨床サンプルの細胞数が少ないため、一部のサンプルがRNaseP増殖曲線を示さない可能性があります。負のRPシグナルは、臨床検体中の2019-nCoVウイルスRNAの存在を排除するものではありません。
- すべての2019-nCoVマーカーの場合 とRNase Pは検体に対して陰性であり、結果は次のようになります。 標本に対して無効と見なされます。残留検体がある場合は、抽出手順を繰り返し、テストを繰り返します。再検査後もすべてのマーカーが陰性のままである場合は、結果を無効として報告し、可能であれば新しい検体を収集する必要があります。

2019-nCoVMarkers（N1およびN2）

- すべてのコントロールが期待されるパフォーマンスを示す場合、すべての2019-nCoVマーカー（N1、N2）サイクルのしきい値成長曲線が40.00サイクル（<40.00 Ct）以内にしきい値ラインを超えず、RNase P成長曲線が交差する場合、検体は陰性と見なされます40.00サイクル（<40.00 Ct）以内のしきい値ライン。
- すべてのコントロールが期待されるパフォーマンスを示す場合、すべての2019-nCoVマーカー（N1、N2）サイクルのしきい値成長曲線が40.00サイクル（<40.00 Ct）以内にしきい値ラインを超えると、検体は2019-nCoVに対して陽性と見なされます。RNase Pは上記のように陽性である場合とそうでない場合がありますが、2019-nCoVの結果は依然として有効です。
- すべてのコントロールが2019-nCoVマーカー（N1、N2）の期待されるパフォーマンスと成長曲線を示し、RNasePマーカーがサイクルしきい値の成長曲線を超えない場合 40.00サイクル（<40.00 Ct）、結果は無効です。検体から抽出したRNAを再検査する必要があります。残留RNAが利用できない場合は、残留検体からRNAを再抽出し、再テストします。再検査されたサンプルがすべてのマーカーとRNasePで陰性の場合、結果は無効であり、患者からの新しい検体の収集を検討する必要があります。
- すべてのコントロールが期待されるパフォーマンスを示し、いずれかのマーカー（N1またはN2、ただし両方のマーカーではない）のサイクルしきい値成長曲線が40.00サイクル以内にしきい値ラインを超える場合（< 40.00 Ct）結果は決定的ではありません。抽出したRNAを再テストする必要があります。残留RNAが利用できない場合は、残留検体からRNAを再抽出し、再テストします。同じ結果が得られた場合、

不確定な結果を報告します。必要に応じて、州の公衆衛生研究所またはCDCに相談して、ガイダンスを要求したり、追加の分析のために検体の移送を調整したりしてください。

- HSCがN1またはN2に対して陽性である場合、抽出またはサンプル処理中に汚染が発生した可能性があります。HSCと一緒に抽出された標本のすべての結果を無効にします。検体とHSCを再抽出し、再テストします。

2019-nCoVrRT-PCR診断パネル結果解釈ガイド

以下の表は、2019-nCoVrRT-PCR診断パネルの期待される結果を示しています。検査室がアッセイコントロールで予期しない結果を取得した場合、または決定的でないまたは無効な結果が得られ、推奨される再テストで解決できない場合は、CDCに連絡して相談および検体の紹介を依頼してください。紹介および連絡先情報については、13ページおよび53ページを参照してください。

2019年 nCoV_N1	2019年 nCoV_N2	RP	結果解釈NS	報告	行動
+	+	±±	2019-nCoV 検出されました	ポジティブ2019-nCoV	送信者。CDCに結果を報告し、
2つのうち1つだけの場合ターゲットはposですitive		±±	決定的ではない結果	決定的ではない	核酸のテストを繰り返し、および/またはrRT-PCRを再抽出して繰り返します。繰り返された結果が決定的でないままである場合は、州の公衆衛生に連絡してください 検体の移送に関する指示またはさらなるガイダンスについては、検査室またはCDC。結果を送信者に報告します。他の呼吸器ウイルスの検査を検討してください。NS
-	-	+	2019-nCoVではない 検出されました	見つかりませんでした	
-	-	-	無効な結果	無効	抽出とrRT-PCRを繰り返します。繰り返された結果が無効なままである場合は、患者から新しい検体を収集することを検討してください。

NS検査室は、必要に応じて、特定の報告システムに準拠して診断結果を報告する必要があります。

NS2019-nCoVによって引き起こされる感染中のウイルスレベルのピークの最適な検体タイプとタイミングは決定されていません。ウイルスを検出するには、同じ患者から複数の検体を収集する必要がある場合があります。患者の最近の曝露または臨床症状が2019-nCoV感染の可能性を示唆し、他の病気の原因（例えば、他の呼吸器疾患）の診断テストが陰性である場合、偽陰性の結果の可能性を特に考慮する必要があります。2019-nCoV感染がまだ疑われる場合は、公衆衛生当局と相談して再検査を検討する必要があります。

品質管理

- 品質管理要件は、地域、州、および連邦の規制または認定要件、およびユーザーのラボの標準的な品質管理手順に準拠して実行する必要があります。適切な品質管理慣行の詳細については、42CFRを参照してください。
  493.1256。
- 品質管理手順は、試薬とアッセイの性能を監視することを目的としています。
- 新しいキットロットごとに診断サンプルを実行する前に、すべてのポジティブコントロールをテストして、すべての試薬とキットコンポーネントが正しく機能していることを確認します。
- Good Laboratory Practice（cGLP）は、各核酸分離バッチにポジティブ抽出コントロールを含めることを推奨しています。
- HSCは2019-nCovrRT-PCR診断パネルに含まれていませんが、HSC抽出制御は、テストする検体のバッチごとに核酸の分離を進める必要があります。
- 各増幅および検出の実行には、常にネガティブテンプレートコントロール（NTC）と適切なポジティブコントロール（nCoVPC）を含めます。検体の品質と抽出を管理するために、すべての臨床サンプルでヒトRNaseP遺伝子をテストする必要があります。

制限事項

- すべてのユーザー、アナリスト、および診断結果を報告する人は、有能なインストラクターによってこの手順を実行するようにトレーニングする必要があります。彼らは、アッセイを独立して実行する前に、テストを実行し、結果を解釈する能力を実証する必要があります。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのパフォーマンスは、上気道および下気道の検体（鼻咽頭または中咽頭の綿棒、喀痰、下気道吸引物、気管支肺胞洗浄、および鼻咽頭洗浄/吸引物または鼻腔など）でのみ確立されています。吸引）。

- 否定的な結果は2019-nCoV感染を排除するものではなく、治療または他の患者管理の決定の唯一の基礎として使用されるべきではありません。2019-nCoVによって引き起こされる感染中のウイルスレベルのピークの最適な検体タイプとタイミングは決定されていません。ウイルスを検出するには、同じ患者から複数の検体（種類と時点）を収集する必要がある場合があります。

- 検体が不適切に収集、輸送、または取り扱われると、偽陰性の結果が生じる可能性があります。増幅阻害剤が検体に存在する場合、または不十分な数の生物が検体に存在する場合にも、偽陰性の結果が生じる可能性があります。
- 正と負の予測値は、有病率に大きく依存しています。病気の有病率が高い場合、偽陰性の検査結果が出る可能性が高くなります。有病率が中程度から低い場合、偽陽性の検査結果が出る可能性が高くなります。
- 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- ウイルスがrRT-PCRの標的領域で変異した場合、2019-nCoVが検出されないか、検出される可能性が低くなる可能性があります。臨床成績は、すべての循環変異体で確立されているわけではありませんが、臨床評価の時間と場所で循環している一般的な変異体を反映していると予想されます。テスト時のパフォーマンスは、SARSCoV-2の新たに出現した株や、時間の経過とともに変化するそれらの有病率など、循環しているバリアントによって異なる場合があります。

- 阻害剤または他のタイプの干渉は、偽陰性の結果をもたらす可能性があります。一般的な風邪薬の効果を評価する干渉研究は実施されませんでした。
- 2019-nCoVによって引き起こされる感染の疫学と臨床スペクトルが完全に知られていないため、テストのパフォーマンスに影響を与える可能性があります。たとえば、臨床医や検査室は、収集する検体の最適なタイプを知らない場合があり、感染の過程で、これらの検体に容易に検出できるレベルのウイルスRNAが含まれている可能性が最も高い場合があります。
- ウイルスRNAの検出は、感染性ウイルスの存在や2019-nCoVが臨床症状の原因物質であることを示していない可能性があります。
- このテストのパフォーマンスは、2019-nCoV感染の治療を監視するために確立されていません。
- このテストのパフォーマンスは、2019-nCoVの存在について血液または血液製剤をスクリーニングするために確立されていません。
- この検査では、他の細菌性またはウイルス性病原体によって引き起こされる病気を除外することはできません。

研究室の認可条件

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの承認書、医療提供者向けの承認済みファクトシート、患者向け の承認済みファクトシート、および承認済みラベルは、FDAのWebサイトで入手できます。 https://www.fda.gov/medical-devices / coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices / in-vitro-diagnostics-euas。

ただし、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル（以下の条件では「お客様の製品」）を使用して臨床検査室を支援するために、関連する承認条件を以下に示します。

- 製品を使用する認定ラボには、CDCWebサイトで入手可能なすべての認定ファクトシートがテスト結果レポートに含まれます。緊急の状況下では、これらのファクトシートを広めるための他の適切な方法が使用される場合があり、これにはマスメディアが含まれる場合があります。
- あなたの製品を使用する認可された研究所は、CDCウェブサイトで利用可能な認可されたラベルに概説されているようにあなたの製品を使用します。認可されたRT-PCR機器、認可された抽出方法、認可された臨床検体タイプ、認可された対照材料、認可されたその他の補助試薬、および製品の使用に必要な認可された材料を含む、認可された手順からの逸脱は、この認可の下では許可されません。
- CDC Webサイトで製品での使用が許容できると特定された、商業的に製造および配布されているプラ イマーおよびプローブセットを受け取り、2019- nCoV（NCoVPC）材料の認可されたヒト検体管理および承認された陽性対照を取得できない認定研究所製品の認可されたラベルで、CDCWebサイトで許容可能な材料として識別された適切な材料を製品で使用するために使用する場合があります。製品を受け取った認定ラボは、テストを開始する前に、関連する公衆衛生当局に製品を実行する意図を通知します。
- 製品を使用する認定ラボでは、必要に応じて、医療提供者および関連する公衆衛生当局に検査結果を報告するためのプロセスが実施されます。

- 認定ラボは、製品のパフォーマンスに関する情報を収集し、DMD / OHT7-OIR / OPEQ / CDRH（電子メール：CDRH-EUA-Reporting@fda.hhs.gov ）およびCDC（respvirus@cdc.gov ）に疑わしいものを報告します。偽陽性または偽陰性の結果の発生、およびそれらが認識しているテストの確立されたパフォーマンス特性からの大幅な逸脱。
- 製品で患者検体をテストする際に検体プーリング戦略を使用する認定ラボには、検体がプーリングの対象となった特定の患者の陰性検査結果レポート、テスト中にプーリングが使用されたという通知、および「ウイルス量の少ない患者検体プールされたテストの感度が低下しているため、サンプルプールで負荷が検出されない場合があります。」

- 患者検体を検査するためのプーリング戦略を実施する認定研究所は、承認されたラベリングで利用可能な「プールされた検体検査の実施とモニタリング」を使用して、プロトコルの推奨事項に基づいてそのような戦略を継続して使用することの適切性を評価する必要があります。
- 認定試験所は、実施された検体プーリング戦略の記録を保持します。これには、戦略のタイプ、実施日、テストされた数量、および検体プーリングテスト戦略のモニタリングプロトコルの一部として生成されたテスト結果データが含まれます。そのような記録は、作成日から最初の12か月間、要求に応じて検査のために48営業時間（2営業日）以内にFDAに提供され、日付から12か月後の妥当な時間内に利用可能になります。彼らの創造。

- 認定ラボは、オンラインのFDAフォーム3500（https://www.accessdata.fda.gov/scripts/medwatch/index.cfm?action=reporting.home）または1-800-FDA-1088に電話してください。

- テストを使用するすべてのラボ担当者は、RT-PCR技術の適切なトレーニングを受け、このキットを取り扱う際に適切なラボおよび個人用保護具を使用し、許可されたラベルに従ってテストを使用する必要があります。
- CDC、IRR、CDC Webサイトで許容できると特定された商用材料の製造業者と販売業者、および製品を使用する認定研究所は、FDAから別途通知されるまで、このEUAに関連するすべての記録を確実に保持します。このような記録は、要求に応じて検査のためにFDAに提供されます。

性能特性

分析パフォーマンス：

検出限界（LoD）：

LoD研究は、すべての（真陽性）の約95%がテスト陽性を再現する2019-nCoVの検出可能な最低濃度を決定します。LoDは、特性化されたサンプルを使用した限界希釈研究によって決定されました。

CDC 2019新規コロナウイルス（2019- nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルに含まれるrRT-PCRアッセイの分析感度は、検出限界研究で決定されました。テストが開発され、この研究が実施された時点では、2019-nCoVの定量化されたウイルス分離株はCDCで使用できなかったため、2019-nCoV RNAの検出用に設計されたアッセイは、in vitroで転写された完全長RNAの特性評価されたストックでテストされました（臨床検体を模倣するために、ヒトA549細胞の懸濁液とウイルス輸送培地（VTM）からなる希釈液にスパイクされた既知の力価（RNAコピー/μL）のN遺伝子; GenBankアクセッション：MN908947.2）。サンプルは、QIAGEN EZ1 AdvancedXL機器とEZ1DSP Virus Kit（Cat＃62724）を使用し、QIAGEN DSP Viral RNA Mini Kit（Cat＃61904）を使用して手動で抽出しました。

各アッセイの予備的なLoDは、各抽出方法を使用して精製されたRNAの3つのサンプルをテストして決定されました。おおよそのLoDは、invitroで転写された完全長RNAの特徴づけられたストックの10倍段階希釈を抽出してテストすることによって特定されました。LoDの確認は、抽出された20の複製を含む3倍段階希釈RNAサンプルを使用して決定されました。LoDは、複製の95%以上（19/20）が陽性である最低濃度として決定されました。

表4.CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの検出限界確認
QIAGEN EZ1DSPを使用

ターゲット	2019-nCoV_N1			2019-nCoV_N2		
RNA濃度[1]	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$
ポジティブ/合計	20/20	19/20	13/20	20/20	17/20	9/20
平均Ct[2]	32.5	35.4	NA	35.8	NA	NA
標準偏差（Ct）	0.5	0.8	NA	1.3	NA	NA

1 濃度はRNAコピー/ µL で表されます

2 95%以上の陽性である希釈について報告された平均Ct。計算には肯定的な結果のみが含まれます。NA該当なし

表5.検出限界CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルと
QIAGEN QIAmpDSPウイルスRNAミニキット

ターゲット	2019-nCoV_N1			2019-nNSoV_N2			
RNA濃度1	10 0.5	10 0.0	10-0.5	10 0.5	10 0.0	10-0.5	10-1.0
ポジティブ/合計	20/20	20/20	6/20	20/20	20/20	20/20	8/20
平均Ct2	32.0	32.8	NA	33.0	35.4	36.2	NA
標準偏差（Ct）	0.7	0.8	NA	1.4	0.9	1.9	NA

1 濃度はRNAコピー/ µLで表されます
2 95%以上の陽性である希釈について報告された平均Ct。計算には肯定的な結果のみが含まれます。NA該当なし

表6.CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの検出限界

ウイルス	素材	検出限界（RNAコピー/µL）	
		QIAGEN EZ1 アドバンストXL	QIAGENDSPウイルスRNAミニキット
2019小説 コロナウイルス	N遺伝子RNA トランスクリプト	10 0.5	10 0

FDA感度評価：テストの分析感度は、該当する場合、および/または利用可能な場合、FDAが開発したプロトコルを使用してFDA推奨の参照資料を評価することによってさらに評価されます。

FDASARS-CoV-2リファレンスパネルテスト

感度とMERS-CoV交差反応性の評価は、参照物質（T1）、ブラインドサンプル、およびFDAが提供する標準プロトコルを使用して実行されました。この研究には、距離計研究とLoDの確認研究が含まれていました。特異性を確立し、LoDを確認するために、ブラインドサンプルテストが使用されました。サンプルは、QIAGEN EZ1DSPウイルスキットを備えたQIAGENEZ1 AdvancedXLを使用して抽出されました。次に、抽出されたサンプルは、ThermoFisherTaqPath™1ステップを使用してApplied BioSystems 7500 FastDxリアルタイムPCR機器の2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用してテストされました。
RT-qPCRマスターミックス。結果は表7にまとめられています。

表7：FDASARS-CoV-2リファレンスパネルを使用したLoD確認結果の要約

FDA提供の参考資料	標本タイプ	製品LoD	クロス-反応性
SARS-CoV-2	NPスワブ	1.8x10⁴ NDU / mL	該当なし
MERS-CoV		該当なし	NS

NDU / mL = RNANAAT検出可能単位/ mL
該当なし：該当なし
ND：検出されません

プライマーおよびプローブ配列のインシリコ分析：

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ配列は、すべてのインフルエンザデータの共有に関するグローバルイニシアチブ（GISAID、 https://www.gisaid.org）2021年6月6日の時点で、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの予測される包括性を示しています。プライマーおよびプローブ結合領域の変化のインシリコ分析モニタリングは、最新の3か月の配列データのスライディングウィンドウを使用して定期的に実行されます。スライディングウィンドウは、新しく報告されたシーケンスの不一致を簡単に識別できるようにするために採用されており、現在循環している株とバリアント間の頻度が強調されています。分析は2回行われます。1回はグローバルGISAIDデータベースを使用し、もう1回はUSシーケンスのみを使用します。

グローバルおよび/またはUS株分析で現在循環している株間で頻度が0.1％を超えるプライマー/プローブ領域のヌクレオチドミスマッチを以下の表8に示します。831,910のうち129の配列は、同じプライマー/プローブ配列内に2つのヌクレオチドのミスマッチがあり、過去3か月間にGISAIDに寄託されたすべてのグローバル配列の1％未満を占めていました。

2021年4月28日に実行されたインシリコ分析で特定された2つの独立した不一致により、CDCはCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのパフォーマンスへの影響をさらに評価しました。関心のある最初のミスマッチは、3位（5 '）でのCからTへの単一ヌクレオチドの変化でした。
> 3 '）のN1プローブ。B.1.526.2バリアントに関連する不一致は、
最近の米国のシーケンスの2.84％に存在します。2021年6月6日の時点で、この突然変異の有病率は

最近の米国のシーケンスの3.69％。この単一のミスマッチによる重大な影響の可能性は低いものの、ミスマッチの頻度の増加と、プローブの5 '末端に向かうFAMフルオロフォアに近い位置により、CDCはパフォーマンスへの影響をチェックしました。B.1.526.2 SARS-CoV-2バリアントを含む5つの別々の臨床検体からの5つのRNAサンプルを、BioSearchとCDC診断パネルプライマーのIDTビルドの両方を使用して2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストしました。およびプローブセット。選択された標本は配列決定され、ミスマッチが含まれていることが確認されました。5つの検体すべてがアッセイで陽性の結果を生成しました（両方のビルド）。ただし、両方のビルドで、N1プライマーおよびプローブセットによって生成されたCt値は、N2プライマーおよびプローブセットで観察されたCt値よりもわずかに高いことが観察されました。差は0.55サイクルから2.07サイクルの範囲で、平均差は1.35サイクルでした。B.1.526.2 RNAサンプルの1つから調製された5倍希釈系列のテストでは、この変異を持つN2プライマーおよびプローブセットと比較して、N1プライマーおよびプローブセットの感度に0〜0.5対数の差がある可能性が示されました。N1プライマーおよびプローブセットの性能に対するこの変異の影響は最小限です。CDC2019-nCoVリアルタイムRt-PCRの全体的な診断パフォーマンスに大きな影響はありません。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。平均差は1.35サイクルです。B.1.526.2 RNAサンプルの1つから調製された5倍希釈系列のテストでは、この変異を持つN2プライマーおよびプローブセットと比較して、N1プライマーおよびプローブセットの感度に0〜0.5対数の差がある可能性が示されました。N1プライマーおよびプローブセットの性能に対するこの変異の影響は最小限です。CDC2019-nCoVリアルタイムRt-PCRの全体的な診断パフォーマンスに大きな影響はありません。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。平均差は1.35サイクルです。B.1.526.2 RNAサンプルの1つから調製された5倍希釈系列のテストでは、この変異を持つN2プライマーおよびプローブセットと比較して、N1プライマーおよびプローブセットの感度に0〜0.5対数の差がある可能性が示されました。N1プライマーおよびプローブセットの性能に対するこの変異の影響は最小限です。CDC2019-nCoVリアルタイムRt-PCRの全体的な診断パフォーマンスに大きな影響はありません。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。この変異を持つN2プライマーおよびプローブセットと比較したN1プライマーおよびプローブセットの感度の5対数の違い。N1プライマーおよびプローブセットの性能に対するこの変異の影響は最小限です。CDC2019-nCoVリアルタイムRt-PCRの全体的な診断パフォーマンスに大きな影響はありません。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。この変異を持つN2プライマーおよびプローブセットと比較したN1プライマーおよびプローブセットの感度の5対数の違い。N1プライマーおよびプローブセットの性能に対するこの変異の影響は最小限です。CDC2019-nCoVリアルタイムRt-PCRの全体的な診断パフォーマンスに大きな影響はありません。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。

2021年4月28日に実行されたインシリコ分析で特定された2番目の関心のあるミスマッチは、N2プローブの位置10（5 '> 3'）でのCからTへの単一ヌクレオチドの変化でした。B.1.1.519バリアントに関連する不一致は、最近のUSシーケンスの4.20％に存在することがわかりました。2021年6月6日の時点で、この突然変異の有病率は最近の米国の配列の3.04％です。この単一のミスマッチによる重大な影響の可能性は低かったものの、IDTバージョンのN2プローブの内部クエンチャーに隣接する位置と相まってミスマッチの頻度が増加したため、CDCはパフォーマンスへの影響をチェックしました。B.1.1を含む5つの別々の臨床検体からの5つのRNAサンプル。519 SARS-CoV-2バリアントは、CDC診断パネルプライマーおよびプローブセットのBioSearchビルドとIDTビルドの両方を使用して、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストされました。標本は配列決定され、含まれていることが確認されました

不一致。IDTビルド（内部クエンチャーあり）とBioSearchビルド（内部クエンチャーなし）の両方を使用したアッセイで、5つの検体すべてが陽性の結果を生成しました。プライマーとプローブセットの両方のビルドにわたるN1とN2のプライマーとプローブセットのCt値は非常に高かった

似ている。したがって、この不一致によるパフォーマンスへの影響は観察されませんでした。この突然変異の現在の存在は、2021年6月6日に実行されたインシリコ分析から表8で見つけることができます。

要約すると、2021年6月6日現在のSARS CoV-2の利用可能な配列と、CDCパネルアッセイのプライマーおよびプローブとの間の相同性の評価は、かなりの数のミスマッチ。60°Cを超える融解温度と55°Cのアニーリング温度を備えたプライマーとプローブの設計は、アッセイの感度を大幅に損なうことなく、場所に応じて最大2つのミスマッチに耐えることができます。

表8.831,910のグローバルゲノムシーケンスと295,775のUSシーケンスの中でCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのSilico包括性分析でGISAIDに提出された2021年6月6日の3か月。

プライマー/プローブ	N2フォワード			N2プローブ			N2リバース	
場所（5 '> 3'）	4	8	16	7	10	13	4	13
ミスマッチヌクレオチド	C> T	C> T	G> T	T> C	C> T	C> T	C> A	G> A
不一致番号（グローバルシーケンス）	1010	1,723	2,362	1051	13,621	1583年	2、004	959
不一致の頻度（%、グローバルシーケンス）	0.12	0.21	0.28	0.13	1.64	0.19	0.24	0.12
不一致番号（米国のシーケンス）	285	873	231	1,018	8,997	569	1,273	377
不一致の頻度（%、USシーケンス）	0.10	0.30	0.08	0.34	3.04	0.19	0.43	0.13

プライマー/プローブ	N1NSワード				N1リバース	N1プローブ							
位置（5 '> 3'）	4	5	9	14	15	2	3	4	5	13	18	22	24
ミスマッチヌクレオチド	C> T	C> T	A> G	G> T	G> T	C> T	C> T	C> T	C> T	G> T	G> T	A> G	C> T
不一致番号（グローバルシーケンス）	909	1,175	3,247	2,092	440	2,073	12、899	1958	2,387	699	859	753	397
ミスマッチ周波数（%、グローバルシーケンス）	0.11	0.14	0.39	0.70	0.05	0.03	1.55	0.24	0.29	0.12	0.10	.091	0.05
不一致番号（我らシーケンス）	131	526	1,024	520	425	193	10,915	1,163	1,107	147	373	716	310
ミスマッチ周波数（%、我らシーケンス）	0.04	0.18	0.35	0.18	0.14	0.07	3.69	0.39	0.37	0.08	0.13	0.24	0.11

特異性/排他性テスト：インシリコ分析

2019-nCoV rRT-PCRアッセイのプライマーとプローブのBLASTn分析クエリは、パブリックドメインのヌクレオチド配列に対して実行されました。データベース検索パラメーターは次のとおりです。1）ヌクレオチドコレクションはGenBank + EMBL + DDBJ + PDB + RefSeqシーケンスで構成されますが、EST、STS、GSS、WGS、TSA、特許シーケンス、およびフェーズ0、1、2は除外されます。 HTGS配列および100Mbより長い配列;
2）データベースは非冗長です。各エントリのアクセッション、GI、タイトル、分類情報を保持しながら、同一のシーケンスが1つのエントリにマージされました。3）データベースは2019年10月3日に更新されました。4）検索パラメータは短い入力シーケンスに合わせて自動的に調整され、期待しきい値は1000です。5）一致スコアと不一致スコアはそれぞれ1と-3です。6）アライメントにギャップを作成および拡張する場合のペナルティは、それぞれ5と2です。

2019-nCoV_N1アッセイ：
2019-nCoV rRT-PCRアッセイN1のプローブ配列は、SARSコロナウイルスおよびBatSARS様コロナウイルスゲノムと高い配列相同性を示しました。しかし、フォワードおよびリバースプライマーは、SARSコロナウイルスおよびバットSARS様コロナウイルスゲノムとの配列相同性を示さなかった。プライマーとプローブを組み合わせると、潜在的な偽陽性rRT-PCRの結果を予測するヒトゲノム、他のコロナウイルス、またはヒトミクロフローラとの有意な相同性はありません。

2019-nCoV_N2アッセイ：
2019-nCoV rRT-PCRアッセイN2のフォワードプライマー配列は、BatSARS様コロナウイルスと高い配列相同性を示しました。リバースプライマーおよびプローブ配列は、ヒトゲノム、他のコロナウイルス、またはヒトミクロフローラとの有意な相同性を示さなかった。プライマーとプローブを組み合わせると、潜在的な偽陽性のrRT-PCR結果の予測はありません。

要約すると、2019-nCoVの特異的検出のために設計された2019-nCoV rRT-PCRアッセイN1およびN2は、潜在的な偽陽性rRT-PCR結果を予測するヒトゲノム、他のコロナウイルス、またはヒトミクロフローラとの有意な複合相同性を示さなかった。

に加えて *インシリコ*分析では、いくつかの生物が抽出され、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストされ、分析の特異性と排他性が実証されました。研究は、QIAGEN EZ1 AdvancedXL機器およびEZ1DSP VirusKitを使用して抽出された核酸を使用して実行されました。核酸は高力価の調製物（通常≥10）から抽出されました$_{5}$ PFU / mLまたは≥10$_{6}$

CFU / mL）。テストは、Thermo FisherScientificTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターを使用して実行されました AppliedBiosystems™7500FastDxリアルタイムPCR装置でミックスCGを行います。データは、CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストしたときに各生物について期待される結果が得られることを示しています。

表9.CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCRDiaの特異性/排他性グノーシス主義パネル

ウイルス	歪み	ソース	2019-ncov_N1	2019-ncov_N2	最後の結果
ヒトコロナウイルス	229E	分離する	0/3	0/3	ネガ。
ヒトコロナウイルス	OC43	分離する	0/3	0/3	ネガ。
ヒトコロナウイルス	NL63	臨床検体	0/3	0/3	ネガ。
ヒトコロナウイルス	HKU1	臨床検体	0/3	0/3	ネガ。
MERS-コロナウイルス		分離する	0/3	0/3	ネガ。
SARS-コロナウイルス		分離する	0/3	0/3	ネガ。
ボカウイルス	-	臨床検体	0/3	0/3	ネガ。
マイコプラズマニューモニアエ		分離する	0/3	0/3	ネガ。
連鎖球菌		分離する	0/3	0/3	ネガ。
インフルエンザA（H1N1）		分離する	0/3	0/3	ネガ。
インフルエンザA（H3N2）		分離する	0/3	0/3	ネガ。
インフルエンザB		分離する	0/3	0/3	ネガ。
ヒトアデノウイルス、1型ヒ	Ad71	分離する	0/3	0/3	ネガ。
トメタニューモウイルス	-	分離する	0/3	0/3	ネガ。
呼吸器合胞体ウイルスライノ	ロングA	分離する	0/3	0/3	ネガ。
ウイルス		分離する	0/3	0/3	ネガ。
パラインフルエンザ1	C35	分離する	0/3	0/3	ネガ。
パラインフルエンザ2	グリーア	分離する	0/3	0/3	ネガ。
パラインフルエンザ3	C-43	分離する	0/3	0/3	ネガ。
パラインフルエンザ4	M-25	分離する	0/3	0/3	ネガ。

内因性干渉物質の研究：

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルは、従来の確立された核酸抽出方法を使用し、推定検出のためのCDCノベルコロナウイルス2012リアルタイムRT-PCRアッセイを含むCDCの他のEUAアッセイでの経験に基づいています中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）とCDCヒトインフルエンザウイルスリアルタイムRT-PCR診断パネルの比較-両方である新規インフルエンザA（H7N9）ウイルスの推定検出のためのインフルエンザA / H7（ユーラシア系統）アッセイ多くの呼吸器検体での使用を目的としているため、一般的な内因性物質からの干渉は予想されません。

検体の安定性と新鮮凍結試験：

感染を検出する可能性を高めるために、CDCは検査のために下気道および上気道の検体を収集することを推奨しています。可能であれば、追加の検体タイプ（糞便、尿など）を収集し、CDCが追加の検体ソースをテストするかどうかを決定するまで、最初に保管する必要があります。症状の発症に関係なく、PUIが特定されたら、できるだけ早く検体を採取する必要があります。検体を採取する際は、適切な感染管理を維持してください。検体は2～8°Cで保管し、アイスパックでCDCに一晩発送します。各検体容器に、患者のID番号（例、医療記録番号）、一意の検体ID（例、検査依頼番号）、検体の種類（例、鼻腔スワブ）、およびサンプルが収集された日付のラベルを付けます。提出された標本ごとにCDCフォーム50.34に記入します。

臨床成績：

2020年2月22日の時点で、CDCは、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用して、米国の調査対象者（PUI）からの2071個の呼吸器検体をテストしました。検体の種類には、気管支液/洗浄液、頬スワブ、鼻洗浄/吸引、鼻咽頭スワブ、鼻咽頭/咽頭スワブ、口腔スワブ、喀痰、中咽頭（喉）スワブ、スワブ（詳細不明）、および喉スワブが含まれます。

表10：CDC 2019の要約-米国のPUI被験者から収集されたヒト呼吸器検体のテストによって生成された新規コロナウイルス（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルデータ

標本タイプ	2019-nCoV ネガティブ	2019-nCoV ポジティブ	決定的ではない	無効	合計
気管支液体/洗浄	2	0	0	0	2
頬スワブ	5	1	0	0	6
鼻洗浄/吸引	6	0	0	0	6
鼻咽頭綿棒	927	23	0	0	950
鼻咽頭綿棒/喉綿棒	4	0	0	0	4
経口綿棒	476	9	0	0	485
咽頭（喉）綿棒	363	10	0	1	374
喀痰	165	5	0	0	170
スワブ（詳細不明）[1]	71	1	0	0	72
組織（肺）	2	0	0	0	2
合計	2021年	49	0	1	2071年

[1]実際の綿棒の種類の情報は、これらの上気道の標本から欠落していました。

CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルによって陰性とテストされた2071呼吸器検体の221（2021）呼吸器検体。CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルによって陽性と判定された2071個の呼吸器検体のうち49個。1つの検体（中咽頭（喉）綿棒）のみが無効でした。CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルで陽性と判定された49の呼吸器検体のうち、17検体は遺伝子配列決定および/またはウイルスによって確認された 文化（正のパーセント一致= 17 / 17、95％CI：81.6％-100％）

テストの初期段階では、46人のPUI被験者から収集された合計117の呼吸器検体も、2019-nCoVのヌクレオカプシドタンパク質遺伝子の別々の独立した領域を対象とする2つの分析的に検証されたリアルタイムRT-PCRアッセイでテストされました。 N4およびN5アッセイ。N4およびN5アッセイのヌクレオカプシドタンパク質遺伝子ターゲットは、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルN1およびN2に含まれる2つのRT-PCRアッセイのヌクレオカプシドタンパク質遺伝子ターゲットとは異なり、独立しています。N4および/またはN5アッセイからの陽性結果は、遺伝子配列決定によってさらに調査されました。

これらの117の呼吸器検体をテストするCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの性能は、複合コンパレーターに対して推定されました。N4アッセイとN5アッセイの両方が陰性の場合、検体はコンパレータ陰性と見なされました。N4および/またはN5アッセイで陽性結果が得られた場合、検体はコンパレータ陽性と見なされ、コンパレータ陽性結果はさらに調査され、遺伝子配列決定によって2019-nCoVRNA陽性であることが確認されました。

表11：CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルとコンポジットコンパレーターの一致率

CDC 2019-nCoV パネル結果	コンポジットコンパレータの結果	
	ポジティブ	ネガティブ
ポジティブ	13[1]	0
決定的ではない	0	0
ネガティブ	0	104

[1]複合コンパレータの結果は、49のCDC2019-nCoVパネル陽性検体のうち13でのみ利用可能でした。

正のパーセント一致= 13/13 = 100%（95%CI：77.2%-100%）負の
パーセント一致= 104/104 = 100%（95%CI：96.4%-100%）

<u>酵素マスターミックスの評価：</u>

ThermoFisherTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックスと次の酵素マスターミックス間の検出同等性の限界を評価しました：Quantabio qScriptXLTワンステップRT-qPCRToughMix、Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）、およびPromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム。2019年の新規コロナウイルス（SARS CoV-2）転写産物の段階希釈は、4つの酵素マスターミックスすべてを使用して、CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルで3回テストされました。オリゴヌクレオチドプローブの両方の製造バージョン、BHQおよびZENを比較に使用した。Quantabio qScript XLT One-Step RT-qPCRToughMixおよびQuantabioUltraPlex 1-Step ToughMix（4X）を使用してすべての複製が陽性とテストされた転写産物の検出可能な最低濃度は、ThermoFisherTaqPath™1-StepRT-で観察されたものと同様でした。 qPCRマスターミックス。PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステムを使用した場合の転写産物の検出可能な最低濃度は、CDCアッセイのBHQバージョンで評価した場合に他の候補で観察されたものより1希釈上でした。候補マスターミックスは、CDCアッセイのZENバージョンで評価した場合、ThermoFisherTaqPath™1ステップRT-qPCRマスターミックスと同等または1希釈ですべて実行されます。

表12：酵素マスターミックスの検出限界の比較–BHQプローブの要約結果

コピー数	サーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス		Quantabio qScript XLT ワンステップRT-qPCR ToughMix		Quantabio UltraPlex 1-ステップToughMix（4X）		PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム	
	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2
10_{2} コピー/ µL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10_{1} コピー/ µL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10_{0} コピー/ µL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
10_{-1} µLをコピーします	2/3	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3

表13：酵素マスターミックスの検出限界の比較–ZENプローブの要約結果

コピー数	サーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス		Quantabio qScript XLT ワンステップRT-qPCR ToughMix		Quantabio UltraPlex 1-ステップToughMix（4X）		PromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRシステム	
	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2
10_{2} コピー/ µL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10_{1} コピー/ µL	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10_{0} コピー/ µL	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3
10_{-1} µLをコピーします	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3

遡及的陽性（18）および陰性（17）の臨床呼吸器検体は、QIAGEN EZ1 AdvancedXL機器およびEZ1DSPウイルスキットを使用して抽出され、Quantabio qScript XLTOneを使用してCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストされました。 -ステップRT-qPCRToughMix、Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）、およびPromegaGoTaq®プローブ1ステップRT-qPCRSystemmasterミックス。3つの酵素マスターミックスはすべて同等に機能し、100%の正と100%の負の一致を示し、期待される結果と95%の信頼区間は82.4%-100%と81.6%-それぞれ100%。

表14：臨床比較–後ろ向き研究の要約結果

CDC 2019-nCoV リアルタイムRT-PCR診断パネル結果	Quantabio qScript XLT ワンステップRT-qPCR ToughMix		Quantabio UltraPlex1ステップToughMix（4X）		PromegaGoTaq®プローブ1-ステップRT-qPCRシステム	
	ポジティブ	ネガティブ	ポジティブ	ネガティブ	ポジティブ	ネガティブ
ポジティブ	18	0	18 0		18 0	
ネガティブ	0	17	0 17		0 17	

Roche MagNA Pure24およびMagNAPure 96抽出プラットフォームの評価：

Roche MagNA Pure24およびMagNAPure96抽出プラットフォームを使用した2019-CoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのパフォーマンスを、承認された抽出方法を使用したパフォーマンスと比較しました。溶解緩衝液中の定量化された不活化SARS-CoV-2ウイルス（USA-WA1 / 2020; 100RNAコピー/µL）の段階希釈液を、プールされた陰性上気道検体マトリックスに添加しました。QIAGEN EZ1 Advanced XL（EZ1 DSPウイルスキットカタログ番号62724）およびRoche MagNA Pure 24（MagNA Pure 24 Total NA分離キットカタログ番号07658036001）およびRoche MagNA Pure 96（MagNA Pure）と並行して、各希釈液の5つのサンプルを抽出しました。 96 DNAおよびウイルス核酸少量キットカタログ番号06543588001）抽出プラットフォームと2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルおよびThermoFisherTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックスを使用して評価。観察されたLoDは、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルですべての複製の100%（合計5つのうち5つ）が両方のプライマー/プローブセット（N1およびN2）に対して陽性であるとテストされた最低濃度として定義されました。 。同等性の許容基準は、同じエンドポイントまたは3倍希釈内で観察されたLoDを示すものとして定義されました。結果は、MagNA Pure24およびMagNAPure 96抽出プラットフォームの両方が、QIAGEN EZ1 AdvancedXL抽出プラットフォームを使用したときに観察されたLoDの同等または1つの3倍希釈内で機能することを示しました。

表15.QIAGEN EZ1 Advanced XL、Roche MagNAPureの検出限界の比較
96、およびCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCRを使用したRocheMagNA Pure24抽出プラットフォーム
診断パネル

プラットホーム	パラメータ	2019-n CoV_N1 As いう			2019-nCoV_N2アッセイ			観察された LoD[1]
QIAGEN EZ1 アドバンストXL	RNAコピー/ µL	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{0.5}$
	＃pos。/ total	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	
	平均Ct[2]	34.0	35.0	36.3	33.9	36.6	NA	
	標準 偏差	0.2	0.8	0.2	0.4	0.9	NA	
ロシュマグナピュア 96	RNAコピー/ µL	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{0.5}$
	＃pos。/ total	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	
	平均Ct[2]	33.3	34.6	36.1	33.2	35.7	NA	
	標準 偏差	0.5	0.5	0.3	0.3	0.4	NA	
ロシュマグナピュア 24	RNAコピー/ µL	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{1.0}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10_{1.0}$
	＃pos。/ total	5/5	3/5	3/5	5/5	5/5	5/5	
	平均Ct[2]	34.4	NA	NA	35.2	36.9	36.2	
	標準 偏差	0.6 0.6	NA	NA	0.5	1.0	0.8	

[1]濃度はRNAコピー/ µLで表されます。観察されたLoDは、両方のアッセイで100%の陽性検出が示された最低濃度です。

[2]100%の陽性を示す希釈について報告された平均Ct。計算には肯定的な結果のみが含まれます。NA =該当なし

Roche MagNA Pure96およびMagNAPure 24抽出プラットフォームの両方を使用して、以前に特徴付けられた臨床的残存検体（14陽性および15陰性）を抽出し、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルおよびThermoFisherTaqPath™1ステップを使用して評価しました。 RT-qPCRマスターミックス。臨床的同等性の許容基準は、認可されたコンパレーター法（QIAGEN EZ1 Advanced XL）で示された定性的結果と100%の一致を示すものとして定義されました。この研究の結果は、Roche MagNA Pureの両方のコンパレーター法と100%の一致を示しました。

CDC2019-nCoVリアルタイムRT-と併用した場合の96およびRocheMagNA Pure24抽出プラットフォーム
PCR診断パネル。

表16.臨床 比較n結果–後ろ向き研究の結果

テストプラットフォーム	テスト プラットホーム 結果	QIAGEN EZ1 前進dXL結果 ポジティブ	ネガティブ	正の%合意（CI）[1]	負の%合意（CI）[1]
ロシュMagNA ピュア96	ポジティブ	14	0	100.0（78.5 – 100.0）	100.0（79.6 – 100.0）
	ネガティブ	0	15		
ロシュMagNA ピュア24	ポジティブ	14	0	100.0（78.5 – 100.0）	100.0（79.6 – 100.0）
	ネガティブ	0	15		

[1] CI = 95%信頼区間

PromegaMaxwell®RSC48抽出プラットフォームの評価：

PromegaMaxwell®RSC48抽出プラットフォームを使用した2019-CoVリアルタイムRT-PCR診断パネルのパフォーマンスを、承認された抽出方法を使用したパフォーマンスと比較しました。VTMで定量化された不活化SARS-CoV-2ウイルス（USA-WA1 / 2020; 100RNAコピー/ µL）の段階希釈液を、プールされた陰性上気道検体マトリックスに添加しました。QIAGENEZ1®AdvancedXL（EZ1 DSPウイルスキットカタログ番号62724）およびPromegaMaxwell®RSC48（PromegaMaxwell®ウイルス全核酸精製キットカタログ番号AS1330）抽出プラットフォームと並行して、各希釈液の5つのサンプルを抽出し、評価しました。 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルとThermoFisherTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックスを使用します。観察されたLoDは、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルですべての複製の100%（合計5つのうち5つ）が両方のプライマー/プローブセット（N1およびN2）に対して陽性であるとテストされた最低濃度として定義されました。 。同等性の許容基準は、同じエンドポイントまたは3倍希釈内で観察されたLoDを示すものとして定義されました。結果は、Maxwell®RSC48抽出プラットフォームのパフォーマンスが、QIAGENEZ1®AdvancedXL抽出プラットフォームを使用したときに観察されたLoDの3倍希釈と同等または1倍以内で機能することを示しました。

表17.CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用したQIAGENEZ1®AdvancedXLとPromegaMaxwell®RSC48抽出プラットフォームの検出限界の比較

プラットホーム	パラメータ	2019-n CoV_N1 As いう			2019-nCoV_N2アッセイ			観察された LoD[1]
QIAGENEZ1® アドバンストXL	RNAコピー/ µL	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10-_{0.5}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10-_{0.5}$	$10^{0.0}$
	＃pos。/ total	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	3/5	
	平均Ct[2]	32.27	33.80	NA	35.13	36.41	NA	
	標準 偏差	0.81	0.40	NA	0.81	0.40	NA	
PromegaMaxwell® RSC 48	RNAコピー/ µL	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10-_{0.5}$	$10_{0.5}$	$10_{0.0}$	$10-_{0.5}$	$10_{0.0}$
	＃pos。/ total	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	
	平均Ct[2]	31.11	32.97	NA	31.89	33.95	35.17	
	標準 偏差	0.24	0.34	NA	0.24	0.35	0.65	

[1]濃度はRNAコピー/ µLで表されます。観察されたLoDは、両方のアッセイで100%の陽性検出が示された最低濃度です。

[2]100%の陽性を示す希釈について報告された平均サイクル閾値（Ct）。計算には肯定的な結果のみが含まれます。NA =該当なし

以前に特徴付けられた臨床的残存検体（15陽性および15陰性）は、現在認可されている QIAGENEZ1®AdvancedXL抽出プラットフォームとともにPromegaMaxwell®RSC48抽出プラットフォームを使用して抽出され、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルおよびサーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス。Maxwell®RSC48の結果を、並行して実行されたQIAGENEZ1®AdvancedXL抽出と比較し、陽性サンプルで100％（15/15）の定性的一致、陰性サンプルで93.3％（14/15）の定性的一致を示しました。この評価は、2つの元々陰性（QIAGENQIAamp®DSPウイルスRNAミニキット）検体（検体16および24）が、QIAGENEZ1®AdvancedXLを使用した抽出後に決定的な結果をもたらさなかったことを示しました。CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを繰り返すと、2つの検体のうちの1つが解決されました（検体24、陰性結果）。2番目の標本（標本16）は決定的ではありませんでした。
これらの標本は両方とも、Maxwell®RSC48で否定的な結果をもたらしました。

表18.臨床 比較結果–後ろ向き研究の結果

<table>
<tr><th rowspan="2">テストプラットフォーム</th><th></th><th colspan="3">プロメガマクスウェル® RSC 48</th><th rowspan="2">ポジティブ％
契約（CI）[1]</th><th rowspan="2">ネガティブ％
契約（CI）[1]</th></tr>
<tr><th>結果</th><th>ポジティブ</th><th>ネガティブ</th><th>決定的ではない</th></tr>
<tr><td rowspan="3">QIAGEN EZ1®
アドバンストXL</td><td>ポジティブ</td><td>15</td><td>0</td><td>0</td><td rowspan="3">100.0
（79.6-100.0）</td><td rowspan="3">93.3
（70.2-98.9）</td></tr>
<tr><td>ネガティブ</td><td>0</td><td>14</td><td>0</td></tr>
<tr><td>決定的ではない</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr>
</table>

[1] CI = 95％信頼区間

廃棄

施設の慣行に従って、危険または生物学的に汚染された物質を処分してください。

参考文献

1.バリュー、HC、*etal*。「ウイルス学における基本的な実験方法」、DHHS、公衆衛生局1975（1981年改訂）、米国疾病予防管理センター、ジョージア州アトランタ30333。

2.臨床検査標準協会（CLSI）、「分子法のための検体の収集、輸送、準備、保管：ガイドライン案」、MM13-A

3.リーバー、M。、*etal*。「」II型肺胞上皮細胞の特性を有するヒト肺癌からの連続腫瘍細胞株。」*がんの国際ジャーナル* 1976、17（1）、62-70。

改訂履歴

リビジョン番号	発効日	改訂の概要
1	2020年2月4日	オリジナルの使用説明書
2	2020年3月15日	•• 使用目的の更新 •• 診断パネルからのN3プライマーとプローブセットの取り外し •• パフォーマンスデータの更新 •• 代替核酸抽出プラットフォームの追加 •• HSCへの許容可能な代替物の追加およびQIAGENRUO抽出試薬の追加 •• 肯定的な結果はもはや推定ではありません。肯定的な結果の確認は必要ありません
3	2020年3月30日	•• 代替酵素マスターミックスオプションの追加
4	2020年6月12日	•• MagNA Pure24抽出法の追加 •• SARS-CoV-2を使用したMagNAPure96抽出法のパフォーマンスデータの追加 •• 試料抽出に代わる熱処理の追加 •• RocheおよびQIAGEN外部溶解バッファーの代替品の追加 •• エンドユーザーがEUAまたはEUAの修正を求めることなく代替コンポーネントを認定することを許可するFDAポリシーの承認
5	2020年7月13日	•• PromegaMaxwell®RSC48抽出法の追加 •• に更新 *インシリコ*包括性分析
6	2020年12月1日	•• 検体プールの指示とモニタリング手順の追加（付録BおよびC） •• Promega Maxwell CSC48抽出装置の追加 •• FDA参照パネルのCDCテストのためのデータの追加
7	2021年7月21日	•• プライマー/プローブ配列のインシリコ分析を更新

連絡先情報、注文、および製品サポート

技術および製品のサポートについては、CDCのウイルス性疾患部門に直接お問い合わせください。

次の宛先に電子メールを送信します。 respvirus@cdc.gov

注：ラボでCDC International Reagent Resource以外の試薬を使用している場合は、市販の資料に付属の製造元の指示を参照してください。

付録A：抽出に代わる熱処理

UltraPlex 1ステップToughMix（4X）

この手順は、公衆衛生研究所のみが使用できます。

目的：

CDCは、テストの大幅な遅延を引き起こす核酸抽出試薬の世界的な不足に対応して、2019-nCoVリアルタイムで使用するための核酸抽出の代替の検体処理として最小限の試薬を必要とする熱処理方法の使用を調査しましたRT-PCR診断パネル。

可能であれば、ラボは、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルによるその後のテストのために、検体の処理に適格なRNAまたは全核酸抽出法を使用する必要があります。抽出により、PCR性能に悪影響を与える可能性のある阻害物質が検体から除去されます。

検体処理に熱処理を使用するこの手順は、適格な抽出試薬の不足が、緊急のCOVID-19検査需要を満たすための検査室の能力を制限する要因である場合にのみ推奨されます。

注意事項/警告/制限：

- CDCはこの熱処理プロセスを評価し、このプロセスが患者検体のSARS-CoV-2の不活化に効果的であると判断しました。
- パフォーマンスは上気道検体のみで評価されました。CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルによるその後のテストのための下気道検体の熱処理は評価されていません。
- 試料の熱処理に関するこの手順は、Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）でのみ使用できます。
- 熱処理は、ラボがPCRによって検体をテストする準備ができている場合にのみ実行する必要があります。熱処理された試験片の試験は、同じ日に実施する必要があります。

許容される標本：

- 上気道検体
  注：血液のように見える、または粒子状物質を含む標本を処理するために熱処理を使用しないでください。このような検体は、試験前に適格なRNAまたはTNA抽出法を使用して抽出する必要があります。

必要な材料（提供されていません）：

- 70%エタノール
- 10%漂白剤、作りたて
- 96ウェルPCR反応プレート（Applied Biosystemsカタログ番号4346906、4366932、4346907、または同等）
- 光学ストリップキャップ（Applied Biosystems 4323032、または同等のもの）

- 1.5 mLSarstedtチューブまたは同等品
- エアロゾル耐性マイクロピペットチップ
- マイクロピペット
- 96ウェルコールドブロック
- 1.5 mL～2.0mLチューブ用のコールドブロック
- ボルテックスミキサー
- 96ウェルプレート遠心分離機または同等品
- サーマルサイクラーまたは同等品
- クラスII生物学的安全キャビネット（BSC）

手順：

サンプル準備

1）BSCを10%漂白剤、続いて70%エタノールで除染します。

2）サンプルが凍結している場合は、氷上または4°Cで解凍します。サンプルチューブの外側を70%エタノールで拭きます。解凍したサンプルをBSCのコールドラックまたは氷の上に置きます。

3）各サンプルをパルスボルテックスし、遠心分離機で短時間スピンダウンして、チューブの底に液体を集めます。

熱処理

1） サーマルサイクラーをBSCに配置し、電源を入れ、95°Cで1分間プログラムした後、4°Cで保持します。

2） 96ウェルPCRプレートをBSCのコールドラックまたは氷上に置きます。

3） 各サンプル100µLを96ウェルPCRプレートに移し、光学ストリップキャップを使用して各ウェルにしっかりとキャップをします。
注：CLIAで必要に応じて、HSC抽出コントロールが各バッチ実行に含まれていることを確認してください。

4） この96ウェルPCRプレートを予熱したサーマルサイクラーに置き、実行を開始します。プレートを4°Cのサーマルサイクラーに置いたままにするか、氷またはコールドブロックの上に置きます。

5） プレートを取り外し、500xで1分間遠心分離します。 *NS* 細胞の破片をペレット化します。

6） プレートをコールドラックまたは氷上に置き、rRT-PCRによる上清のテストに進みます。

7） 熱処理された試験片の試験は、熱処理が行われるのと同じ日に行われなければなりません。長期間保管する場合は、元の検体を≤-70°Cに保ってください。

熱処理された試験片の特別な試験上の考慮事項：

酵素マスターミックス

- 熱処理された試験片の試験を実施する必要があります
ともに **Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）**、 最高を示した
熱処理された試験片での性能。熱処理された検体のPCR試験は、この使用説明書の本文にある指示に従う必要があります。

不確定で無効な結果の解決

- 決定的でないまたは無効な結果を生成した熱処理された検体の再試験には、適格なRNAまたは全核酸（TNA）抽出法（可能な場合）による元の検体の抽出を含める必要があります。不確定または無効な試験結果を解決するために、熱処理された試験片材料を再試験しないでください。

検証：

CDCは、診断に使用する前に、適格な抽出方法とこの熱処理方法を使用して陽性および陰性の臨床検体のパネルを並べて準備し、その後CDC 2019でテストすることを含む、熱処理方法の検証研究の実施を推奨しています- nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル。

性能特性：

Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）

検出限界の比較

不活化されたSARS-CoV-2 [SARS-CoV-2 USA-WA1 / 2020]の段階希釈液は、シミュレートされた検体材料（ウイルス輸送培地に懸濁されたヒトA549細胞）で調製されました。各濃度は、EZ1抽出と熱処理の両方によって5回並べて調製しました。続いて、抽出または熱処理された各サンプルは、Applied Biosystems 7500 FastDx機器でQuantabioUltraPlex 1ステップToughMix（4X）を使用して、CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルによってテストされました。観察された検出は、2つの標本調製方法間で類似していた。

表1：QIAGEN EZ1 AdvancedXL抽出と熱のUltraPlex検出限界の比較
御馳走t（95°Cで1分間）メソッド–要約結果

エンザイム	プラットホーム	パラメータ	2019-nC oV_N1 アッセイ					2019-nC oV_N2 アッセイ					観察された LoD[1]
Quantabio UltraPlex 1-ステップToughMix（4X） 5 µLテンプレートの追加	QIAGEN EZ1 高度 NSL	RNAコピー/ µL	$10^{1.0}$	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$	$10^{-1.0}$	$10^{1.0}$	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$	$10^{-1.0}$	$10^{0.5}$
		＃pos。/ total	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	2/5	
		平均Ct[2]	34.11	34.59	NA	NA	NA	32.97	33.76	34.70	NA	NA	
		標準 偏差	0.75	0.99	NA	NA	NA	0.33	0.72	0.98	NA	NA	
	熱 処理 95°C NSまたは1 NSNS	RNAコピー/ µL	$10^{1.0}$	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$	$10^{-1.0}$	$10^{1.0}$	$10^{0.5}$	$10^{0.0}$	$10^{-0.5}$	$10^{-1.0}$	$10^{0.5}$
		＃pos。/ total	5/5	5/5	4/5	5/5	1/5	5/5	5/5	4/5	2/5	1/5	
		平均Ct[2]	33.41	34.32	NA	36.73	NA	33.45	35.25	NA	NA	NA	
		標準 偏差	0.62	0.40	NA	0.82	NA	0.40	0.80	NA	NA	NA	

[1]濃度はRNAコピー/ µLで表されます。観察されたLoDは、両方のアッセイで100%を示した最低濃度です。

ポジティブ検出。
[2]100%の陽性を示す希釈について報告された平均Ct。計算には肯定的な結果のみが含まれます。

NA =該当なし

臨床比較

Qiagen EZ1抽出装置による抽出と熱処理を使用して、39個の上気道検体のパネルを並べてテストしました。続いて、抽出および熱処理された検体は、Quantabio UltraPlex 1ステップToughMix（4X）を使用してCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでテストされました。定性的な結果を比較して、一致を示しました。

表2：臨床Comparison結果の概要–熱処理とQIAGEN EZ1 Advanced XL

	テスト結果	N治療を食べる			合計	ポジティブ % 契約（CI）[1]	ネガティブ % 契約（CI）[1]
		ポジティブ	決定的ではない	ネガティブ			
QIAGEN EZ1 アドバンストXL	ポジティブ	18	1	0	19	94.7（75.4-99.1）	100（83.9-100）
	決定的ではない	0	0	0	0		
	ネガティブ	0	0	20	20		
	合計	18	1	20	39		

[1] CI = 95%信頼区間

質問とコメント：

この手順について質問やコメントがある場合は、次の宛先に電子メールで送信してください。 respvirus@cdc.gov

付録B：プールされた標本の準備と処理

目的：

CDCは、より高いスループットのテストアプローチに対する強い需要と、テストの大幅な遅延を引き起こす核酸抽出試薬の世界的な不足に応えて、検体のプーリングを評価し、最大4つの検体のプーリングが2019-での使用に適していると判断しました。 nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル。

検体のプーリングは、検査感度のわずかな低下を引き起こす可能性があるため、検査スタッフ、機器、または試薬が検査需要に対応するには不十分な場合のスクリーニングまたは診断検査に最も適している可能性があります。検体のプーリングは、疾患の有病率が低い場合にのみスループットの利点を示します。したがって、検査室は、検体のプールが個々の検体検査よりも検査スループットの利点を提供し続けるかどうかを判断するために、検体陽性率を経時的に監視する必要があります。実装に関する考慮事項の詳細については、付録Cを参照してください。

この手順では、最大4つの検体のプールサイズを準備、処理、およびテストするプロセスについて説明しますが、2〜4の検体プールサイズは、CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでの使用が許可されています。4検体未満のプールサイズを使用する場合は、以下の手順をモデルとして使用してください。患者検体中のSARS-CoV-2の不活化を確実にするために、プールされた検体の投入量およびプールされた検体と溶解バッファーの容量比は、以下に規定されたままでなければばなりません（溶解バッファーの比率を下げないでください）。Nプール標本アプローチには、以下のプール標本抽出手順で必要なプール標本入力の合計量を作成するために、一緒にプールされたN標本のそれぞれの等量を含める必要があります。

注意事項/警告/制限：

- 検体をプールすると、感度が低下する可能性があります。プールされた手順の検体は希釈され、その結果、特定の検査の検出限界を下回る低濃度のウイルス遺伝物質が生じる可能性があります。
- 検体をプールする場合、検査前に他の検体と組み合わされるため、検査室は個々の検体の診断の完全性を保証できません。検体の完全性は、スワブ検体収集の品質によって影響を受ける可能性があり、その結果、一部のスワブでは、検出用のウイルス遺伝物質の量が制限される可能性があります。ウイルス遺伝物質の量が限られているものを含む不十分な個々の検体は、テスト前にプールされた検体から排除されない可能性があり、このプロセスを通じて陰性として報告される可能性があります。
- この標本プーリングプロセスのパフォーマンスは、鼻咽頭（NP）スワブで評価されました。CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルでのその後のテストのための他のタイプの検体のプールは評価されていませんが、証拠は、他の上気道スワブ検体のCt値分布がNPスワブ検体で観察されたものと類似していることを示唆しています。

- プーリングは、プーリングを検討している検体の母集団での診断テストにCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用した経験が10日以上あるラボでのみ実装する必要があります。

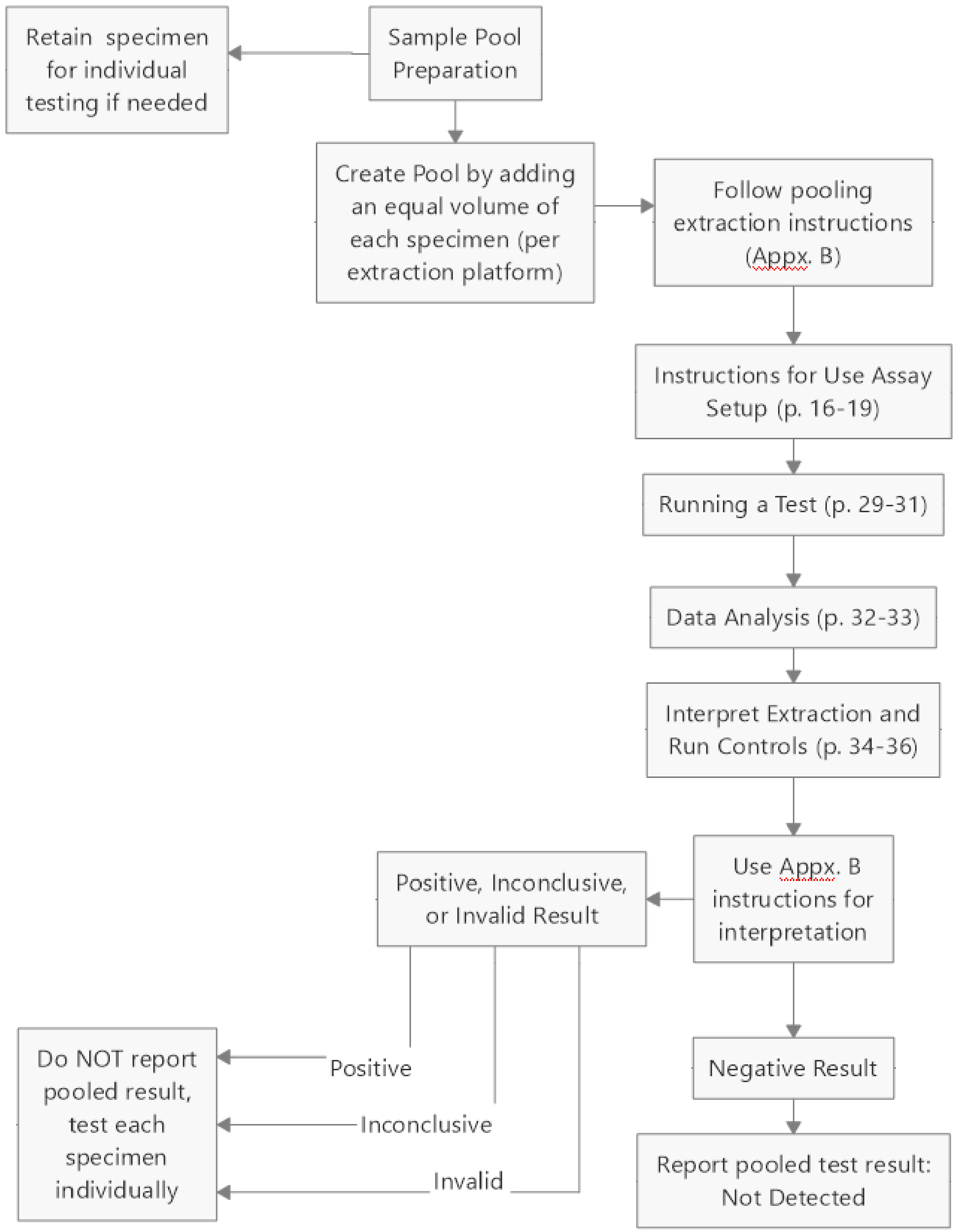
- 検体をプールするためのこの手順は、QIAGEN EZ1 Advanced XL、Roche MagNA Pure 96、および Promega Maxwell RSC48機器での使用についてのみ評価されています。他の抽出方法を使用したプーリングは、このEUAでは許可されていません。
- 検体プールの検査が陽性、不確定、または無効である場合に、個々の検体のその後の抽出と検査を可能にするために、十分な量の検体が利用可能でなければなりません。
- 適切な通訳、報告、および次のステップは、サーベイランステストでは異なる場合があり、以下の診断通訳の指示によって制限されません。
- ラボは、テストの需要がラボの容量を超えなくなったとき、および/またはテスト試薬が不足しなくなったときに、プーリングが引き続き意味をなすかどうかの問題を再検討することをお勧めします。

<u>許容される標本タイプ：</u>

- 上気道スワブ（例、鼻咽頭（NP）スワブ、中咽頭（OP）スワブ、NP / OPスワブの組み合わせ、鼻スワブ）
  注：試験片は、プールされた試験片のテストとその後の個別の再テストをサポートするのに十分な量を持っている必要があります。

プールされた検体検査の概要：

このフローチャートは、プールされた標本のテストに関連するステップの概要と、ドキュメント内の各ステップの指示の場所を提供します。個々の検体試験とプールされた検体検査の両方で同一の手順については、使用説明書の本体に説明書が記載されています。プールされた試験片の試験が個々の試験片の試験と異なるステップについては、プールされた試験片の試験に固有の指示がこの付録に示されています。



手順：

標本プールの準備

1）BSCを10%漂白剤、続いて70%エタノールで除染します。

2）検体が凍結している場合は、氷上または4°Cで解凍します。検体チューブの外側を70%エタノールで拭きます。解凍した検体をBSCのコールドラックまたは氷の上に置きます。

3）各検体をパルスボルテックスし、遠心分離機で短時間スピンダウンして、チューブの底に液体を集めます。

4）各検体プールについて、プールに含まれる各検体の等量（抽出プラットフォームに必要な総量に応じて）を、ヌクレアーゼフリーの滅菌チューブに追加します。

5）各検体プールをパルスボルテックスし、短時間遠心分離してチューブの底に液体を集めます。

6）以下の変更された抽出パラメータを使用して抽出に進みます。

抽出手順

注：これらのプールされた検体の抽出手順は、プールされた検体を処理する際の核酸の回収を最適化するように変更されています。個々の検体をテストするときは、個々の検体の抽出手順（p。14-16）に従ってください。

QIAGEN EZ1 Advanced XL

- キット：オフボード溶解用のQiagen EZ1DSPウイルスキットおよびバッファーAVL（別売り）
- カード：EZ1 Advanced XLDSPウイルスカード
- 手順：200µLのプールされた検体を200µLの事前に分注されたバッファーAVLに追加します（総入力サンプル量は400µLです）。EZ1 AdvancedXLでの抽出を続行します。溶出量は60µLです。

Roche MagNA Pure 96

- キット：Roche MagNA Pure 96DNAおよびViralNA Small Volume Kit
- プロトコル：ウイルスNA血漿Ext LysExt Lys SV4.0プロトコルまたはウイルスNA血漿ExtLysSVプロトコル
- 指示：総入力サンプル量が450µLになるように、プールした検体225µLを事前に分注したMagNA Pure 96外部溶解バッファー（別売り）225µLに追加します。MagNA Pure 96での抽出を続行します（内部コントロール=なし）。
- 溶出量は50µLです。

プロメガマクスウェルRSC48またはマクスウェルCSC48

- キット：PromegaMaxwell®ウイルス全核酸精製キット
- プロトコル：ウイルスの総核酸
- 手順：240µLのプールされた検体を660µLの事前に分注された外部溶解バッファー（600µLの溶解バッファーと60µLのプロテイナーゼK;キットに付属）に追加します（総入力量は900µLです）。Maxwell®RSC48またはMaxwellCSC48で抽出を続行します。
- 溶出量は50µLです。

テスト、解釈、およびレポートの手順

1）抽出後、使用説明書の次のセクションで概説されている手順を使用してPCRテストを続行します：アッセイのセットアップ（p。16-20）、テストの実行（p。29-32）およびデータ分析（p。33 -34）。

2）使用説明書の次のセクションで概説されているように、コントロールとPCRテスト結果を解釈します：結果とレポートの解釈（p。35-37）、2019-nCoV rRT-PCR診断パネル結果解釈ガイド（p.38）。すべての抽出およびPCR実行コントロールは、期待どおりに実行する必要があります。

A.標本プールが生成する場合 **ネガティブ** 結果については、プールに含まれる各検体について「未検出」と報告してください。試験結果報告書には、試験片がプールされた形式で試験されたという記述を含める必要があります。それ以上のテストは必要ありません。

B.標本プールが生成する場合 **ポジティブ** 結果、結果を報告しないでください。使用説明書に従って、プールに含まれる各標本を個別にテストします。各標本の個別の結果を報告します。

C.標本プールが生成する場合 **決定的ではない** 結果、結果を報告しないでください。使用説明書に従って、プールに含まれる各標本を個別にテストします。各標本の個別の結果を報告します。

D.標本プールが生成する場合 **無効** 結果、結果を報告しないでください。使用説明書に従って、プール内の各標本を個別にテストします。各標本の個別の結果を報告します。

検証：

検証は、診断テスト用のプーリングを実装する前に、すべてのラボで実施する必要があります。メソッド検証研究に加えて、検証には、ラボの検体およびプールのラベリング、追跡、およびラボ情報管理システムによるレポートのプロセスの精度と機能の検証を含める必要があります。

性能特性：

プーリングの検証

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-を使用した検体プーリングの評価には、25%（5）が弱い陽性範囲（Ct 36.00-39.99）を表す20の陽性の以前に特徴づけられた鼻咽頭（NP）検体のパネルを使用しました。 PCR診断パネル; 80の陰性NP検体も含まれていました。これらの検体は、1つの陽性検体と3つの陰性検体を組み合わせることにより、20の陽性4検体プールを作成するために使用されました。等量の4つの陰性検体を組み合わせることにより、20の陰性プールも作成されました。これらのプールをテストし、プールテストの定性的結果を個別テストの結果と比較して、4検体プールを使用したテストに対するCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの正と負のパーセント一致を決定しました。4検体プーリングの性能は、QIAGENEZ1®AdvancedXL、Promega Maxwell RSC 48、またはRoche MagNA Pure96プラットフォームを使用して評価されました。患者検体をプールするために、各抽出プラットフォームの入力および出力ボリュームに変更が加えられました。

プーリングによる希釈効果を補正します。
QIAGENEZ1®AdvancedXL

個々のポジティブパネルメンバーとポジティブおよびネガティブプールは、Applied Biosystems 7500Fastでのその後のテストのためにQIAGENEZ1®AdvancedXLプラットフォームを使用して抽出されました。
サーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス、CGを使用したDx。20個の4検体プールで得られた結果を、個々のテストの結果と比較しました。陽性検体を含むプールは、プールが陽性または不確定な結果を生成した場合（つまり、SARS-CoV-2特異的プライマーおよびプローブセットの少なくとも1つが40未満のCt値を生成した場合）、個々のテストの結果と一致すると見なされました。）。プールされた検体の結果が陰性であった場合（すなわち、SARS-CoV-2特異的プライマーとプローブセットのどちらも陽性の結果を生成しなかった場合）、陰性検体プールは期待される結果と一致すると見なされました。

パネルメンバーの個別試験とプールされた検体試験の定性的試験結果の比較を、陽性および陰性検体プールの個別試験の結果との試験合意とともに、以下の表1に要約します。弱い陽性カテゴリー（元の診断結果によって決定された）の5つの陽性検体パネルメンバーのうち、1つは個別にテストした場合は不確定な結果を返しましたが、4検体プールでテストした場合は陽性結果を返しました。1つは、個別にテストした場合は否定的な結果を返しましたが、4つの標本プールでテストした場合は肯定的な結果を返しました。個別にテストした場合、および4つの標本プールでテストした場合、3つは一致していました。

表1-プールテストと個別テストの概要-QIAGENEZ1®AdvancedXL

テストプラットフォーム		個別のテスト結果			ポジティブプール	ネガティブプール
	結果	ポジティブ	不確定†	ネガティブ	パーセント合意（CI）1	パーセント合意（CI）1
4検体プーリング結果	ポジティブ	17	1	1	100% (82.4-100)	95.2% (77.3-99.2)
	決定的ではない‡	1	0	0		
	ネガティブ	0	0	20		

1CI = 95%信頼区間
†個別にテストされた決定的な結果は、最終的なパフォーマンス計算には含まれません。
‡決定的でないプールされた結果は、最終的なパフォーマンス計算のために個別にテストされた肯定的な結果と一致していると見なされます。

プロメガマクスウェルRSC48

個々のポジティブパネルメンバーとポジティブおよびネガティブプールは、Applied Biosystems 7500Fastでのその後のテストのためにPromegaMaxwell RSC48プラットフォームを使用して抽出されました。
サーモフィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス、CGを使用したDx。20個の4検体プールで得られた結果を、個々のテストの結果と比較しました。陽性検体を含むプールは、プールされた検体が陽性または不確定な結果を生成した場合（すなわち、SARS-CoV-2特異的プライマーおよびプローブセットの少なくとも1つがCt値を生成しなかった場合）、個々のテストの結果と一致すると見なされました40より）。プールされた検体の結果が陰性であった場合（つまり、SARS-CoV-2特異的プライマーとプローブセットのいずれも陽性の結果を生成しなかった場合）、20の陰性検体プール（4つの既知の陰性検体から作成）は期待される結果と一致すると見なされました。

パネルメンバーの個別試験とプールされた検体試験の定性的試験結果の比較を、陽性および陰性検体プールの個別試験の結果との試験合意とともに、以下の表2に要約します。弱い陽性カテゴリー（元の診断結果によって決定された）の5つの陽性検体パネルメンバーのうち、1つはテスト時に陽性結果を返しました

個別に、しかし4つの標本プールでテストしたときに否定的な結果を返しました。個別にテストした場合と4つの標本プールでテストした場合、4つは一致していました。さらに、1人の中程度から高い陽性のパネルメンバーは、個別にテストしたときに決定的な結果を返しませんでしたが、陽性を返しました
4つの標本プールでテストした場合の結果。

表2-プールされたテスト結果と個別のテスト結果の概要– Promega Maxwell RSC 48

テストプラットフォーム		個別テスト結果			ポジティブプール パーセント合意（CI）[1]	ネガティブプール パーセント合意（CI）[1]
	結果	ポジティブ	不確定[†]	ネガティブ		
4検体 プーリング結果	ポジティブ	16	1	0	94.7% (75.4-99.1)	100% (83.9-100)
	決定的ではない[‡]	2	0	0		
	ネガティブ	1	0	20		

[1]CI = 95%信頼区間
[†]個別にテストされた決定的な結果は、最終的なパフォーマンス計算には含まれません。
[‡]決定的でないプールされた結果は、最終的なパフォーマンス計算のために個別にテストされた肯定的な結果と一致していると見なされます。

MagNAピュア96

個々のポジティブパネルメンバーとポジティブおよびネガティブプールは、Thermoを使用したApplied Biosystems 7500 Fast Dxでのその後のテストのために、MagNA Pure96プラットフォームで抽出されました。
フィッシャーTaqPath™ワンステップRT-qPCRマスターミックス、CG。20個の4検体プールで得られた結果を、個々のテストの結果と比較しました。陽性検体を含むプールは、プールされた検体が陽性または不確定な結果を生成した場合（すなわち、SARS-CoV-2特異的プライマーおよびプローブセットの少なくとも1つがCt値を生成しなかった場合）、個々のテストの結果と一致すると見なされました40より）。プールされた検体の結果が陰性であった場合（つまり、SARS-CoV-2特異的プライマーとプローブセットのいずれも陽性の結果を生成しなかった場合）、20の陰性検体プール（4つの既知の陰性検体から作成）は期待される結果と一致すると見なされました。

パネルメンバーの個別試験とプールされた検体試験の定性的試験結果の比較を、陽性および陰性検体プールの個別試験の結果との試験合意とともに、以下の表3に要約します。弱い陽性カテゴリー（元の診断結果によって決定された）の5つの陽性検体パネルメンバーのうち、1つは個別にテストした場合は不確定な結果を返しましたが、4検体プールでテストした場合は陽性結果を返しました。個別にテストした場合と4つの標本プールでテストした場合、4つは一致していました。

表3-プールされたテスト結果と個別のテスト結果の概要– Roche MagNA Pure 96

テストプラットフォーム		個別テスト結果			ポジティブプール あたりント契約（CI）[1]	ネガティブプール Percent契約（CI）[1]
	結果	NSsitiveインコ	包括的†	ネガティブ		
4検体 プーリング結果	ポジティブ	18	1	0	100% (83.2-100)	100% (83.9-100)
	決定的ではない‡	1	0	0		
	ネガティブ	0	0	20		

[1]CI = 95%信頼区間

†個別にテストされた決定的な結果は、最終的なパフォーマンス計算には含まれません。

‡決定的でないプールされた結果は、最終的なパフォーマンス計算のために個別にテストされた肯定的な結果と一致していると見なされます。

インシリコで *感度*

NS *インシリコ*分析は、QIAGENEZ1®AdvancedXL抽出プラットフォームを使用して、CDC2019-Novelコロナウイルスリアルタイムrt-PCR診断パネルの臨床感度に対する4サンプルプーリングの影響を評価するために実施されました。この分析は、「Pooling Validation」データを使用してPassing-Bablok回帰を実行し、各ターゲットの4検体プール（1つの陽性検体と3つの陰性検体の組み合わせ）の希釈効果から生じるCtシフトを計算することによって実施されました。回帰分析では、X軸は陽性検体の個々のCt値を表示し、Y軸は1つの陽性検体と3つの陰性検体の対応するプールのCt値を表示しました。回帰分析を使用して、Ct値の間隔を計算しました[X *、

QIAGENEZ1®AdvancedXL抽出プラットフォーム（n = 381）を使用してCDCで処理された個別にテストされたNPスワブ標本の結果を分析して、 *インシリコ*4検体プーリングのPPA。[X *、40]の範囲のCt値を持つ個々の標本の数が決定されました。N1ターゲットのX *値は37.2で、N2ターゲットのX *値は37.5でした。表4に要約された結果は、標本の97.1%（370/381 95%CI 94.9-98.3%）が、4つの標本プールに結合された場合に否定的な結果をもたらさないことを示しています。

NSできる4.4。 *インシリコ*うんちの感度lQIAGENEZ1®を使用して抽出されたed標本 Advanced XL

NS	N1間隔 [X *、40]	の数 のサンプル N1Ct値 間隔で	N2間隔 [X *、40]	の数 のサンプル のN2Ct値 間隔	の数 のサンプル 両方のターゲットCt の値 間隔	ネガ	株式会社	位置	% ポジティブ パーセント 合意*
381	[37.2、40]	16	[37.5、40]	63	11	11	57	313	97.1

*負ではないプールは個々のサンプルとして再テストされるため、正のパーセント合意には、負ではなかったすべてのプールが含まれます。

テストのためにCDCに提出された検体には、公衆衛生研究所の手で決定的な結果を生み出さなかった多くのものが含まれ、さらなるテストのためにCDCに転送されました。したがって、CDCが検査のために受け取った検体は、弱い陽性のカテゴリーを過大に表しています。CDCはまた、3つの追加の地理的位置から個別にテストされたNPスワブ標本の結果を取得しました：州ラボ1（n = 2217）、州立研究所2（n = 6559）、および州立研究所3（n = 2315）。これらのデータセットは、

各サイトで収集された弱い陽性（Ct 36.00-39.99）の割合。表5に要約されている結果は、州保健局の研究所で受け取った弱い陽性のNP検体の割合がCDCで得られたものよりも少ないことを示唆しています。したがって、*インシリコ*表4に要約されている分析は、4検体のプーリングが、平均よりも多い弱い陽性検体の母集団をテストするために適用されるシナリオでのPPAを示しています。

表5.3つの地理的位置と比較したCDCでの弱い陽性検体の割合

		Ct <36.0		Ct 36.0-39.99	
	NS	N1	N2	N1	N2
CDC	381	314（82.4%）	254（66.7%）	67（17.6%）	127（33.3%）
状態1	2217	2121（95.7%）	2021年（91.2%）	150（6.8%）	250（11.3%）
状態2	6559	6343（96.7%）	5883（89.7%）	216（3.3%）	676（10.3%）
状態3	2315	2073（89.5%）	1884（81.4%）	242（10.5%）	431（18.6%）

参照：

1. Abdalhamid、B。、*etal*。「SARSCoV-2検査リソースを節約するための検体プーリングの評価。」*Jクリンパスです*2020、153、715-718。

質問とコメント：

この手順について質問やコメントがある場合は、次の宛先に電子メールで送信してください。 respvirus@cdc.gov

付録C：プールされた標本テストの実装と監視

目的：

これらの指示は、ラボや管轄区域がプールされた検体検査の効率と有効性を長期にわたって実装および監視するのを支援することを目的としています。ラボは、プーリング戦略を実施する前に、対象集団内での診断テストのためにCDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを実行した経験が最低10日ある必要があります。

検査室は、付録Bで説明されているように、検査室と患者集団のプールの利点とプールに関連する潜在的なリスクを比較検討する必要があります。圧倒的な試験要求および/または試験材料の不足に対処するためにプーリングが実装されている場合、試験所の能力とリソースが許せば、試験所は個々の検体試験に戻ることを検討する必要があります。

標本プーリング戦略の実施前：

- 個々の検体の陽性率（P個人）あなたのテスト母集団のために。
  標本プーリングを実装する前に、テスト母集団からのテストデータを評価します。
  陽性率（P個人）これは、陽性結果の数を、これらの7〜10日間にテストされた検体の総数で割ったものです。NS個人 プーリングを検討する必要があるかどうかを判断するために使用され、プーリング戦略のパフォーマンスを監視するために使用されます。

  ノート： Pを使用して、4サンプルプーリングの効率を計算するには個人、式F = 1 /（1+ 1 / n-（1- P個人）n）、ここで、Fは効率、nはプールサイズです。たとえば、P個人 は1%、効率Fはn = 4の場合3.46です。これは、1,000回のテストで平均3,460人の患者のテストをカバーできることを意味し、これはテスト量の71%の削減に相当します。この式を使用すると、プールサイズがn = 3の場合、Pでn = 4よりも効率が高くなります。個人 ≥13%。

- 陽性のしきい値を特定します。

表1：個々の検体の陽性率とプーリングによる検査量の減少との関連

検体陽性レート（P）	いいえ、テストします 4標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト とボリューム 4標本 プーリング	いいえ、テストします 3標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト とボリューム 3標本 プーリング	いいえ、テストします 2標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト とボリューム 2標本 プーリング
1%	87	71%	109	64%	156	48%
2%	98	67%	118	61%	162	46%
3%	109	64%	126	58%	168	44%
4%	120	60%	135	55%	174	42%
5%	131	56%	143	52%	179	40%
6%	141	53%	151	50%	185	38%
8%	160	47%	166	45%	191	36%
10%	178	41%	181	40%	207	31%
11%	187	38%	189	37%	212	29%
12%	195	35%	196	35%	218	27%
13%	203	32%	202	33%	223	26%
14%	211	30%	209	30%	228	24%

検体陽性 レート（P）	いいえ、テストします 4標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト とボリューム 4標本 プーリング	いいえ、テストします 3標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト とボリューム 3標本 プーリング	いいえ、テストします 2標本 のためのプーリング 300人の患者	の削減 テスト Volume with 2標本 プーリング
15%	218	27%	216	28%	233	22%
16%	226	25%	222	26%	238	21%
17%	233	22%	228	24%	243	19%
18%	239	20%	235	22%	248	17%
19%	246	18%	241	20%	253	16%
20%	252	16%	246	18%	258	14%

ノート： 表1は、各プレートでポジティブ、ネガティブ、および抽出コントロールを実行することを考慮していません。

ノート： 網掛けのないセルは、他のプールサイズと比較してテストボリュームが最適に減少していることを示しています。

表1は、さまざまな検体陽性率でのプーリングによって達成される効率の推定増加を示しています。検査室は、この表を使用し、プールの有効性を監視して検体の陽性閾値（$P_{しきい値}$）（1）4検体のプーリングが適切であり、（2）より小さな検体プールが適切であり、（3）検体プーリングが試験能力/試薬消費の利点を提供しないしきい値。これらのしきい値は、ラボのプーリング監視プロセスについて文書化する必要があります。

例：ラボでは、テストボリュームの30%の削減を、有益であると見なされるために必要な最小のテストボリュームの削減と見なす場合があります（これは主観的です）。したがって、検査室は陽性閾値（$P_{しきい値}$）12%で[2] 4検体プーリングの場合、3検体プーリングの場合は14%、2検体プーリングの場合は10%以下。

注：Pをお勧めします$_{しきい値}$ どのプールサイズでも20%を超えてはなりません。さらに、検査室は、プーリング戦略をいつ検討するかについて、20%未満の閾値陽性率を選択する場合があります。

- ラボの検体プーリング戦略/プロセスを定義して文書化します。
- プールされた検体試験の実験室性能を検証します（CLIA要件）。
- ラボのプーリング戦略を通じて生成された結果の品質を保証するために適切なプーリング監視プロセスを確立して実装します。プーリング監視プロセスは、ラボのPを文書化する必要があります$_{しきい値}$ プールサイズごとに、$P_{個人}$ 以下のモニタリング要件に対処するためのラボのプロセス。
- この付録に記載されている監視プロセスからの情報だけが、プーリングのパフォーマンスの問題を監視したり、プーリング戦略の意思決定を支援したりするのに役立つ情報ではないことに注意してください。したがって、検査室は、COVID-19の有病率の他の情報源を監視するか、ターゲット母集団の陽性率情報をテストして、それらの傾向を

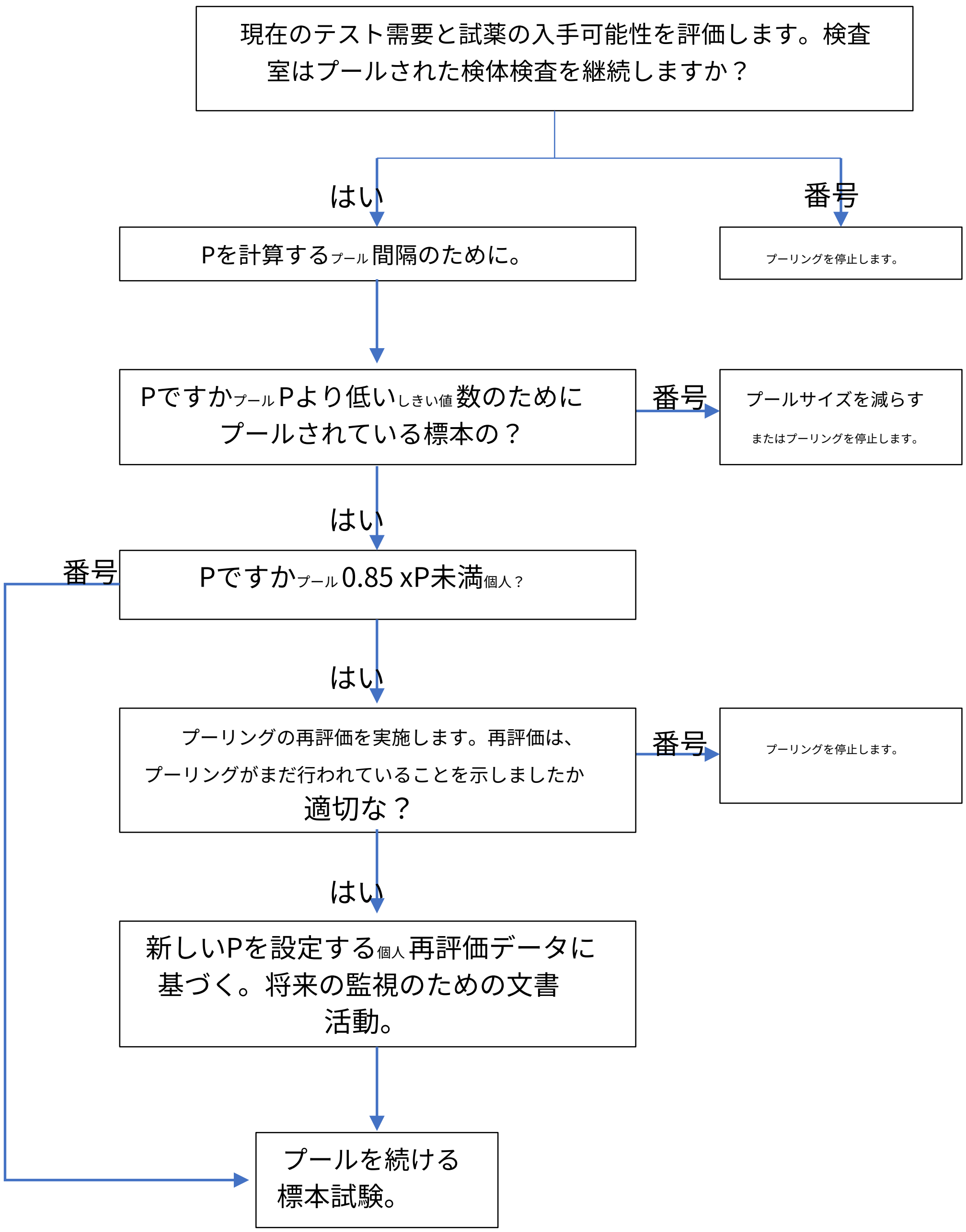
[2] Pで$_{個人}$ ≥13%、n = 3はn = 4よりも高い効率を提供するため、Pをお勧めします$_{しきい値}$ n = 4の場合、12%を超えてはなりません。

以下のアプローチに加えて、ラボのプーリング監視プロセスの一部としてのプーリングテストの傾向。

プーリング戦略の監視

定期的に（最低でも毎週、7〜10日の平均移動が望ましい継続的な分析）、ラボは以下に説明するように検体プールの陽性率を監視する必要があります。

図1：定義された間隔で実行されるプーリング監視プロセスの概要



各間隔で実行されるデータ監視手順

1.今後のプールされた検体検査の必要性を評価します。

テストの需要を評価し、リソースの可用性をテストします。試験能力と資源の利用可能性が検体プーリングを使用せずに試験需要を満たすのに十分である場合、プーリングによる試験感度の低下とプーリングの余分な努力のリスクがプールされた検体試験の利点を上回るかどうかを検討してください。

2.プールされた正のパーセント（Pプール）間隔のために。

NSプール= ポジティブな結果を生み出すプーリング戦略の下でテストされた標本 / プーリング戦略の下でテストされた総標本

3.間隔Pを確認しますプール陽性閾値に対して（Pしきい値）使用中のプールサイズ。

Pを比較するプールプーリングの実装中に確立された標本陽性閾値までの現在の間隔。

- Pの場合プールPより大きいしきい値使用中のプールサイズについては、テスト母集団で検体陽性率が低下するまで、プールサイズの縮小または検体プールの中止を検討してください。
- Pの場合プールP未満ですしきい値、手順4に進みます。

4.間隔Pを確認しますプール再評価基準に対して

Pを比較するプール上個人。

- Pの場合プールPの85%以上である個人。（（NSプール ≥0.85×P個人）、その後、この間隔で監視チェックが完了します。現在のプーリング戦略を続行します。
- Pの場合プールPの85%未満です個人。（（NSプール< 0.85×P個人）、プールされた検体の試験プロセスがまだ受け入れられるかどうかを判断するには、再評価が必要です。以下の「プーリングの再評価」セクションに進んでください。

5.Pを更新します個人再評価によって示された場合。

再評価が実施され、n検体のプーリングが依然として許容可能であることが示された場合は、再確立します。
NS個人再評価中に生成されたデータを使用して、ラボで。

再評価中に10個の陽性検体が検査された場合：

P個人 再評価に使用された10の陽性検体 / 10個の陽性検体に到達するためにテストされた検体の総数 NS $\frac{10}{11}$

再評価中に20の陽性検体が検査された場合：

P個人 再評価に使用された20の陽性検体 / 20の陽性検体に到達するためにテストされた検体の総数 NS $\frac{20}{21}$

この更新された新しい陽性率は、Pとして使用する必要があります個人将来の監視で。

説明：この計算では、再評価のために10個（または20個）の個別の陽性サンプルが収集された母集団の個別の検査陽性率を推定しようとします。10（または

20）再評価のための連続した陽性サンプルは10で停止されます$_{NS}$（または20$_{NS}$）陽性サンプルの場合、10 / N *（または20 / N *）の陽性率は過大評価される可能性があります。NS$_{個人}$ 上記の計算では、適切な乗数を含めることで修正されます。10個の陽性サンプル再評価データの推定陽性率は（10 / N *）×（10/11）であり、20個のサンプルの推定陽性率は（20 / N *）×（20 / 21）。

プーリングの再評価：

プーリングの再評価は、モニタリング活動によって示されるように実施する必要があります。2つの可能なアプローチを以下に示します。

オプション1

コレクションに10個の陽性検体が含まれるまで、入ってくる患者検体を個別にテストする必要があります。

- これらの標本を使用して、10 *NS*-標本プールを作成してテストする必要があり、それぞれに1つの陽性と（*NS*-1）陰性検体。
- 個々のテスト結果とプールされたテスト結果の間のPPAを計算します。

  ノート： PPAの計算では、陽性または不確定な結果を生成するすべてのプールは、個別にテストされた陽性結果と一致していると見なされます。

オプション2

入ってくる患者の標本は、プールでテストし続けることができます。

- 再評価研究は時間T0から開始する必要があり、プールされたテストと並行して個別のサンプルテストで構成する必要があります。ただし、すべての非負のサンプルプールでは、nサンプルのプーリングとデコンボリューションのワークフローの一部として、プールに含まれるすべての個別のサンプルを個別にテストする必要があるため、再評価の調査は、基本的に、負のnサンプルからの個別のサンプルのテストで構成されます。プール。
- 再評価研究は、nサンプルのプーリングおよびデコンボリューションワークフローに続く非ネガティブサンプルプールからのサンプルの個別テストから生成されたポジティブ個別結果の両方を含む、最低10の連続したポジティブ個別結果が得られた時点T1で一時停止する場合があります。 T0からT1 [T0、T1]までの期間のネガティブサンプルプールからのサンプルの個々のテストから得られたポジティブな個々の結果。
- 陰性プール間の陽性の個々のサンプル結果の数がKであることを考慮すると、nサンプルプールのテストと候補テストを使用した単一検体の分析の間のPPAは、PPA（EUAテストプールとEUAテスト個体）= 100%x（10 -K）/ 10。期間[T0、T1]からのすべての連続する陽性サンプルがPPA計算に含まれることが重要です。PPAの計算に関しては、プールされたサンプルをテストするすべての非負の結果は、個別にテストされた正の結果と一致するものとしてカウントする必要があります。

オプション1およびオプション2の再評価受け入れ基準

- •• プールされたテスト結果と個別のテスト結果の間のPPAが90%以上（10のうち9または10のうち10）である場合、を使用してテストを続行します。 *NS*-標本のプーリングは許容されます。
- •• プールされたテスト結果と個別のテスト結果の間のPPAが85%未満の場合：
  - o PPA≤70%（10のうち7）の場合は、プールサイズを減らし（n＝3と見なします）、再実行を繰り返します。個々の検査と比較したプールのPPAが90%以上になるまでの新しいプールサイズでの評価検査、または患者検体のプールの中止を検討してください。
  - o PPAが80%（10のうち8）の場合、さらに10回連続して個別にポジティブを収集しますサンプル。次に、プールされたテスト結果と個々のテスト結果の間で、20サンプルの結合データからPPAを計算します。PPAが85%以上の場合、nサンプルプーリングを使用したテストの実装は許容されます。または、失われた感度を補うために、プールサイズを減らし（n＝3と考えてください）、個々のテストと比較したプールのPPAが85%以上になるまで、新しいプールサイズで再評価テストを繰り返します。
- •• どのプールサイズでも85%以上のPPAに到達できない場合は、患者検体のプールを中止してください。
- •• nサンプルのプーリングが許容できる場合は、「データ監視」の手順5に戻って、Pを再確立します。個人。

追加リソース：

1. Abdalhamid、et al。、Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing resources、Amer J Clin Pathol。、Vol 153、June 2020、Pages 715–718。 https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa064。

2.COVID-19の分子検査にプールされたサンプルを使用することの実現可能性に関する助言。 https://www.icmr.gov.in/pdf/covid/strategy/Advisory_on_feasibility_of_sample_pooling.pdf

3.3。 CDC、SARS-CoV-2診断、スクリーニング、および監視テストでのプーリング手順の使用に関する暫定ガイダンス。 https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html

質問とコメント：

この手順について質問やコメントがある場合は、次の宛先に電子メールで送信してください。 respvirus@cdc.gov。

****破棄しないでください：重要な製品固有の情報******

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル–検証要件

緊急使用許可（EUA）に基づく診断テストについては、メディケア＆メディケイドサービスセンター（CMS）からの次のガイダンスを参照してください。
https://www.cms.gov/Medicare/Provider-Enrollment-and-Certification/SurveyCertificationGenInfo/Policy-and-Memos-to-States-and-Regions-Items/QSO18-19-CLIA

使用目的

CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、上気道および下気道の検体（医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人から収集した鼻咽頭または口腔咽頭スワブ、喀痰、下気道吸引物、気管支肺胞洗浄、および鼻咽頭洗浄/吸引物または鼻吸引物として）1.1。

この検査は、最大4つの個々の上気道スワブ検体（鼻咽頭（NP）、中咽頭（OP）、NP / OPの組み合わせ、または鼻腔）を含むプールされたサンプル中のSARS-CoV-2からの核酸の定性的検出にも使用されます。医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人からの輸送媒体を含む個々のバイアルを使用して収集した綿棒）。プールされたテストからの否定的な結果は、決定的なものとして扱われるべきではありません。患者の臨床徴候および症状が否定的な結果と矛盾する場合、または患者管理に結果が必要な場合は、患者を個別の検査の対象と見なす必要があります。結果が陽性、不確定、または無効であるプールに含まれる標本は、結果を報告する前に個別にテストする必要があります。

テストは、1988年の臨床検査改善修正（CLIA）、42USC§263aの下で認定された、高度に複雑なテストを実行するための要件を満たす検査室に限定されています。

結果はSARS-CoV-2RNAの同定のためのものです。SARS-CoV-2 RNAは一般に、感染時に上気道および下気道の検体で検出可能です。陽性の結果は、SARS-CoV-2による活発な感染を示していますが、細菌感染または他のウイルスとの同時感染を除外するものではありません。検出された薬剤は、病気の明確な原因ではない可能性があります。米国およびその領土内の研究所は、すべての結果を適切な公衆衛生当局に報告する必要があります。

否定的な結果はSARS-CoV-2感染を排除するものではなく、治療または他の患者管理の決定の唯一の基礎として使用されるべきではありません。否定的な結果は、臨床観察、患者の病歴、および疫学情報と組み合わせる必要があります。

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用したテストは、リアルタイムRT-PCRアッセイの実行に熟練した訓練を受けた実験室職員による使用を目的としています。CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、食品医薬品局の緊急使用許可の下でのみ使用されます。

必要な材料

2019年の新規コロナウイルス陽性対照（nCoVPC）は、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルに付属しており、

[1] このEUAの場合、医療提供者には、医師、看護師、薬剤師、技術者、研究所長、疫学者、またはその他の開業医や関連する医療専門家が含まれますが、これらに限定されません。

* * *破棄しないでください：重要な製品固有の情報***

使用。nCoVPCは、2019-nCoVN遺伝子のRNA転写物とヒトRNaseP遺伝子セグメントで構成されています。nCoVPCは、2019-nCoV_N1、2019-nCoV_N2、およびRPのプライマーおよびプローブセットで陽性の結果をもたらします。

テストには、約2 mLの上気道検体（輸送媒体中の鼻咽頭スワブ（NPS）など）が必要です。利用できる検体が2mL未満の場合は、検体をプールすることができます。

追加の試薬、材料、および指示については、CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの添付文書（製造元の指示）を参照してください。

予防

この試薬は、偽陽性の結果を引き起こす可能性のある実験装置や試薬の汚染を避けるために、承認されたバイオセーフティーレベル2（BSL-2）の取り扱いエリアで取り扱う必要があります。この製品はRNA転写物であり、非感染性です。ただし、nCoVPCは、Good LaboratoryPracticesに従って処理する必要があります。

試薬を適切な温度で保存し（使用説明書を参照）、解凍したら氷上に置きます。

呼吸器検体を取り扱う際は、標準的な予防措置を講じてください。

QIAampで抽出する前にサンプルを準備するための指示® DSPウイルスRNAミニキットまたは QIAamp® ウイルスRNAミニキット

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します μnCoVPCのLを45に μLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート560 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに溶解緩衝液Lを入れます。
- 140を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク14 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク14 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク14 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

QIAGENEZ1で抽出する前にサンプルを準備するための指示® ADVANCED XL

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します μnCoVPCのLを45に μLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート280 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに溶解緩衝液Lを入れます。
- 120を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。

＊＊＊破棄しないでください：重要な製品固有の情報＊＊＊

- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

ROCHEMagNAピュアトータル核酸キットまたはROCHEMagNAピュア核酸分離キットIを使用して抽出する前にサンプルを準備するための手順

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します μnCoVPCのLを45に µLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート300 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに溶解緩衝液Lを入れます。
- 100を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

ROCHE MagNA PURE24および全核酸分離キットを使用して抽出する前にサンプルを準備するための手順

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します μnCoVPCのLを45に µLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート400 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに溶解緩衝液Lを入れます。
- 100を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

ROCHE MagNA PURE 96DNAおよびVIRALNA SMALL VOLUMEKITを使用して抽出する前にサンプルを準備するための手順

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します μnCoVPCのLを45に µLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート350 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに溶解緩衝液Lを入れます。
- 100を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。

******破棄しないでください：重要な製品固有の情報******

- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

PROMEGAMAXWELLで抽出する前にサンプルを準備するための指示® RSC 48

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します µnCoVPCのLを45に µLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート330 µ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに1 Lの溶解バッファー（300 µLの溶解バッファー+ 30 µLのProteinase K、キットに含まれています）。
- 120を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

BIOMÉRIEUXNucliSENSeasyMAGまたはBIOMÉRIEUXEMAGで抽出する前にサンプルを準備するための手順

- 使用する材料の再構成については、2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。RNAは、調製および使用中は低温に保つ必要があります。
- 5を追加してnCoVPCの1/10希釈を作成します µnCoVPCのLを45に µLのヌクレアーゼフリー水または10mMTris。
- アリコート1000µLまたは2000 µeasyMAGまたはeMAG用にそれぞれ1〜9のラベルが付いた9本のチューブのそれぞれに事前に分注されたeasyMAG溶解バッファーのL。
- 100を追加 µ溶解緩衝液を含む9本の標識チューブのそれぞれに上気道検体（例えば、ウイルス輸送培地中のNPS）のL。
- 中程度の濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解バッファーと検体を含む1〜3のラベルが付いた各チューブに、希釈されていないnCoVPC（CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に記載されているように再水和）のL。
- 低濃度でサンプルを調製するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む4-6とラベル付けされた各チューブへのnCoVPCの1/10希釈液のL。
- ネガティブサンプルを準備するには、スパイク12 µ溶解緩衝液と検体を含む7-9とラベル付けされた各チューブへのヌクレアーゼフリー水のL。
- CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、9つのサンプルすべての抽出を実行します。

手順

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書に従って、抽出された9つのサンプルを少なくとも1回テストします。

推測される結果

中程度のnCoVPCサンプルは2019-nCoVに対して陽性であるはずです。低
nCoVPCサンプルは2019-nCoVに対して陽性であるはずです。
2019-nCoVの場合、陰性の上気道サンプルは陰性である必要があります。

テスト結果の90％以上は、期待される結果と一致している必要があります。テスト結果が期待される結果と一致して90％未満の場合は、CDCに連絡してください。respvirus@cdc.gov。

＊＊＊破棄しないでください：重要な製品固有の情報＊＊＊

制限

このテストは、FDAの認可または承認を受けていません。

このテストは、認可された研究所による使用のためにEUAの下でFDAによって認可されています。

このテストは、2019-nCoVからの核酸の検出に対してのみ許可されており、他のウイルスや病原体に対しては許可されていません。

このテストは、連邦食品医薬品局のセクション564（b）（1）に基づくSARS-CoV-2の検出および/または診断のためのinvitro診断の緊急使用の許可を正当化する状況が存在するという宣言の期間中にのみ許可されます。医薬品化粧品法、21USC§360bbb-3（b）（1）。ただし、認可がより早く終了または取り消される場合を除きます。

質問

質問やコメントをメールで送信してください respvirus@cdc.gov。

分布

Centers for Disease Control and Prevention、1600 Clifton Road、Atlanta、GA、30329USAによって資格のある研究所に配布されました

＊＊*破棄しないでください：重要な製品固有の情報***

CDC2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネル
EMERGENCY USE AUTHORIZATION（EUA）でのみ使用します。
Rxのみ

カタログ： 2019-nCoVEUA-01

キットロット：

有効期限：

使用目的

CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、上気道および下気道の検体（医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人から収集した鼻咽頭または口腔咽頭スワブ、喀痰、下気道吸引物、気管支肺胞洗浄、および鼻咽頭洗浄/吸引物または鼻吸引物として）1.1。

この検査は、最大4つの個々の上気道スワブ検体（鼻咽頭（NP）、中咽頭（OP）、NP / OPの組み合わせ、または鼻腔）を含むプールされたサンプル中のSARS-CoV-2からの核酸の定性的検出にも使用されます。医療提供者がCOVID-19の疑いのある個人からの輸送媒体を含む個々のバイアルを使用して収集した綿棒）。プールされたテストからの否定的な結果は、決定的なものとして扱われるべきではありません。患者の臨床徴候および症状が否定的な結果と矛盾する場合、または患者管理に結果が必要な場合は、患者を個別の検査の対象と見なす必要があります。結果が陽性、不確定、または無効であるプールに含まれる標本は、結果を報告する前に個別にテストする必要があります。

試験は、1988年の臨床検査改善修正（CLIA）、42の下で認定された検査室に限定されています。
USC § 263a、非常に複雑なテストを実行するための要件を満たしています。

結果はSARS-CoV-2RNAの同定のためのものです。SARS-CoV-2 RNAは一般に、感染時に上気道および下気道の検体で検出可能です。陽性の結果は、SARS-CoV-2による活発な感染を示していますが、細菌感染または他のウイルスとの同時感染を除外するものではありません。検出された薬剤は、病気の明確な原因ではない可能性があります。米国およびその領土内の研究所は、すべての結果を適切な公衆衛生当局に報告する必要があります。

否定的な結果はSARS-CoV-2感染を排除するものではなく、治療または他の患者管理の決定の唯一の基礎として使用されるべきではありません。否定的な結果は、臨床観察、患者の病歴、および疫学情報と組み合わせる必要があります。

CDC 2019-nCoVリアルタイムRT-PCR診断パネルを使用したテストは、リアルタイムRT-PCRアッセイの実行に熟練した訓練を受けた実験室職員による使用を目的としています。CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルは、食品医薬品局の緊急使用許可の下でのみ使用されます。

パッケージの内容

包装	成分	部 番号	成分 整理番号	VIALS キットあたり	量 /瓶	州
オリゴヌクレオチド 箱	2019-nCoV_N1の組み合わせ プライマー/プローブミックス			1	22.5 nmol	乾燥
	2019-nCoV_N2結合 プライマー/プローブミックス			1	22.5 nmol	乾燥
	RP複合プライマー/プローブ ミックス			1	22.5 nmol	乾燥
コントロールボックス	nCoVPC2019-nCoVポジティブ コントロール（非感染性）			4	1 x 10^4 コピー/ µL	乾燥

IVD

1 このEUAの場合、医療提供者には、医師、看護師、薬剤師、技術者、研究所長、疫学者、またはその他の開業医や関連する医療専門家が含まれますが、これらに限定されません。

保管手順

受領後、2〜8°Cで保管してください。使用する試薬を開いて準備する前に、CDC 2019-Novel Coronavirus（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書を参照してください。

手順/解釈/制限

ユーザーはを参照する必要があります **CDC 2019-新規コロナウイルス（2019-nCoV）リアルタイムRT-PCR診断パネルの使用説明書** 緊急使用許可の下で使用されるすべてのIVD製品についてFDAのWebサイトに掲載されています。
http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm。

このテストは、FDAの認可または承認を受けていません。

このテストは、認可された研究所による使用のためにEUAの下でFDAによって認可されています。

このテストは、2019-nCoVからの核酸の検出に対してのみ許可されており、他のウイルスや病原体に対しては許可されていません。

このテストは、連邦食品医薬品局のセクション564（b）（1）に基づくSARS-CoV-2の検出および/または診断のためのinvitro診断の緊急使用の許可を正当化する状況が存在するという宣言の期間中にのみ許可されます。医薬品化粧品法、21USC§360bbb-3（b）（1）。ただし、認可がより早く終了または取り消される場合を除きます。

予防

この試薬は、偽陽性の結果を引き起こす可能性のある実験装置や試薬の汚染を避けるために、承認されたBSL-2取り扱いエリアで取り扱う必要があります。この製品は非感染性です。ただし、この製品は、GoodLaboratoryPracticesに従って取り扱う必要があります。

試薬の苦情/質問

この製品について質問/コメントがある場合は、CDCウイルス性疾患/呼吸器ウイルス部門に電子メールで連絡してください。
respvirus@cdc.gov。

配布元

Centers for Disease Control and Prevention、1600 Clifton Road、Atlanta、Georgia、30329、USAによって製造されています

IVD